

UNIVERSIDAD DE ALCALA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**Modulación de la expresión de los receptores de
quimioquinas CCR5 y CXCR3 en las células T CD8+
durante el tratamiento de la infección crónica por virus
de la hepatitis C y su correlación con el desarrollo de
respuesta virológica sostenida.**

TESIS DOCTORAL

Autor: Joaquín Miquel Plaza. Año 2010

Director: Juan Ramón Larrubia Marfil

AGRADECIMIENTOS

A JR, alma y cerebro de este estudio y a Selma y Miriam, su brazo ejecutor.

Al resto de miembros de la Unidad de Hepatología Traslacional, por su entusiasmo y buen hacer.

A mi padre, que, esté donde esté, seguro que se sentirá muy feliz y orgulloso.

A mi madre y hermana que, por fin, podrán presumir de tener un doctor en la familia.

A mi hijo Pablo que, sin duda, constituye el trabajo más importante y gratificante de mi vida, y a Yolanda, responsable principal del mismo y co-autora del que hemos escrito juntos en estos últimos 20 años.

ÍNDICE.

	<i>Página</i>
<i>I. <u>RESUMEN</u></i>	5
<i>II. <u>INTRODUCCIÓN</u></i>	9
<i>II.1. Importancia del problema</i>	<i>9</i>
<i>II.2. Características del virus</i>	<i>11</i>
<i>II.3. Historia natural</i>	<i>12</i>
<i>II.4. Patogenia de la infección por VHC</i>	<i>13</i>
<i>II.4.1 Ciclo vital del virus</i>	<i>13</i>
<i>II.4.2 Mecanismos de daño hepático y control viral</i>	<i>13</i>
<i>II.4.3 Mecanismos de respuesta inmune frente al virus</i>	<i>14</i>
<i>II.5. Papel de las citoquinas en la hepatitis crónica por VHC</i>	<i>21</i>
<i>II.6. Quimioquinas asociadas a respuesta tipo Th1/Tc1</i>	<i>30</i>
<i>II.7 Mecanismos del VHC para evadir la respuesta inmune del huésped ..</i>	<i>36</i>
<i>II.7.1 Alteración de la respuesta innata</i>	<i>38</i>
<i>III.7.2 Alteración de la respuesta inmune específica</i>	<i>41</i>
<i>II.8 Papel de las quimioquinas y sus receptores en el aclaramiento o cronicación del virus</i>	<i>43</i>
<i>II.9 Citoquinas y daño hepático</i>	<i>51</i>
<i>III. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></i>	52
<i>IV. <u>DISEÑO, MATERIAL Y MÉTODOS</u></i>	56
<i>IV.1 Ámbito del estudio</i>	<i>56</i>

IV.2 Selección de los sujetos del estudio.....	56
IV.3 Pacientes, material y métodos experimentales.....	57
IV.3.1 Sujetos seleccionados.....	57
IV.3.2 Recogida y procesamiento de muestras y datos clínicos	59
IV.4 Análisis estadístico.....	64
V. <u>RESULTADOS</u>.....	65
V.1 Expresión de CCR5 ^{elevado} /CXCR3 ^{elevado} en la población de células CD8+ intrahepáticas.	65
V.2 Correlación entre la frecuencia de células CD8+ CCR5 ^{elevado} /CXCR3 ^{elevado} intrahepáticas y grado de inflamación hepático.....	69
V.3 Expresión de CCR5 ^{elevado} /CXCR3 ^{elevado} en células de sangre periférica después de 24 semanas de tratamiento antiviral.....	71
V.4 Modificaciones en la concentración sérica de CXCL10 y CCL3 durante el tratamiento antiviral.....	73
V.5 Correlación entre el grado de expresión de receptores de quimioquinas en las células CD8+ y respuesta virológica sostenida a tratamiento antiviral	77
VI. <u>DISCUSIÓN</u>.....	79
VII. <u>CONCLUSIONES</u>.....	93
VIII. <u>APÉNDICES</u>.....	95
VIII.1 Abreviaturas utilizadas.....	95
VIII.2 Índice de gráficos	97

<i>VIII.3 Índice de tablas.....</i>	100
<i>X. <u>FINANCIACIÓN</u>.....</i>	101
<i>X. <u>REFERENCIAS</u>.....</i>	102

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) se caracteriza por su gran capacidad para evadir la respuesta inmune y cronificarse. Un posible mecanismo de escape viral a la respuesta inmune podría ser la alteración de la capacidad quimiotáctica de las células T citotóxicas hacia el hígado infectado, actuando sobre la interacción de los receptores de quimioquinas y sus ligandos.

OBJETIVOS

Analizar la capacidad del VHC para modificar la expresión de quimioquinas asociadas a respuesta T citotóxica tipo 1 (Tc1) y de sus receptores en las células T citotóxicas como mecanismo de escape viral, e investigar los efectos del tratamiento antiviral con interferón PEGilado (PEG-IFN) y Ribavirina (RBV) sobre dicho proceso y su correlación con el desarrollo de respuesta virológica sostenida (RVS).

METODOS

Se determinó el grado de expresión de CCR5 y CXCR3 (receptores de quimioquinas asociados a respuesta Tc1) en los linfocitos T CD8+ intrahepáticos y en sangre periférica de pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1, así como la concentración de sus ligandos en suero (CXCL10 y CCL3), correlacionando dichos hallazgos con el grado de inflamación y fibrosis hepática en estos pacientes.

Además, en pacientes con hepatitis crónica por VHC genotipo 1 tratados con PEG-IFN alfa-2b y RBV se cuantificó en sangre periférica la expresión de estos receptores y sus ligandos a lo largo del tratamiento. Se analizó el valor predictivo positivo (VPP) y

negativo (VPN) de las variaciones de la frecuencia de células T CD8+ CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} durante el tratamiento para predecir el desarrollo de RVS.

RESULTADOS

En los pacientes con hepatitis crónica C, se observó un secuestro intrahepático de las células T CD8+ con fenotipo CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado}, existiendo una correlación positiva entre la frecuencia de dichas células en el hígado y el grado de inflamación hepática.

En el compartimento periférico la frecuencia de células T CD8+ CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} fue menor en los pacientes con infección persistente por VHC respecto a controles sanos, mientras que la concentración sérica de sus ligandos fue mayor. Durante el tratamiento con PEG-IFN y RBV se observó un aumento significativo de la frecuencia de células T CD8+ con fenotipo CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} en las primeras 24 semanas de tratamiento antiviral que se correlacionó con un descenso de la concentración sérica de sus ligandos (CXCL10 y CCL3).

Finalmente, el grado de variación de la expresión de CXCR3 en los pacientes con infección crónica por VHC en las primeras 24 semanas de tratamiento antiviral mostró un significativo valor predictivo positivo de desarrollo de RVS.

CONCLUSIONES

En la hepatitis crónica por VHC genotipo 1, el tratamiento anti-viral induce un incremento de la frecuencia de células T CD8+ que expresan receptores de quimioquinas asociados a respuesta Tc1 y una reducción en la concentración sérica de sus ligandos. El desarrollo del control viral se asocia a un incremento de la frecuencia de células T CD8+ que expresan CXCR3^{elevado}.

BACKGROUND

AIMS

CXCR3 and CCR5 play a major role in recruiting cytotoxic T cells (Tc) and secreting secondary type 1 cytokines (Tc1) in the liver. HCV could impair their expression as a survival mechanism. The role of these chemokine receptors on CD8+ cells in chronic hepatitis C is analysed.

METHODS

Serum, chemokines, peripheral blood and intrahepatic lymphocytes from chronic hepatitis C patients were studied. CXCR3 / CCR5 expressing CD8+ cells were quantified by flow-cytometry. Serum chemokines concentration (CXCL10/CCL3) was measured by ELISA. Basal data were correlated with liver inflammation. Longitudinal data were obtained during treatment and correlated with virologic response.

RESULTS

CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells were enriched in the liver and correlated with inflammation. Chronic HCV patients presented the same frequency of CCR5^{high}/CXCR3^{high} expressing CD8+ cells in peripheral blood as in healthy controls but higher serum concentration of CXCL10/CCL3. Treatment with PEG-interferon a-2b plus ribavirin increased CCR5^{high}/CXCR3^{high} expressing CD8+ cells frequency in peripheral blood and decreased CXCL10/CCL3 serum concentration. Increase in CXCR3^{high} expressing CD8+ cells after 24 weeks of treatment was correlated with SVR.

CONCLUSIONS

In chronic hepatitis C, anti-viral treatment induces an increase in CD8⁺ cells expressing chemokine receptors associated with Tc1 response and a reduction in their ligands. Achievement of viral control is associated with an increase in CXCR3^{high} expressing CD8⁺ cells during treatment.

II.- INTRODUCCIÓN

1.- IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus hepatotrope, no citopático, muy eficiente en evadir la respuesta inmune del huésped.

La infección por el VHC constituye la principal causa de enfermedad hepática en todo el mundo¹. La organización mundial de la salud (OMS) calcula que aproximadamente un 3% de la población mundial (unos 170 millones de personas) están infectadas por este virus, existiendo 3-4 millones de infecciones *de novo* cada año².

En España se calcula que la prevalencia de anticuerpos frente al VHC (anti-VHC) en la población general oscila entre un 1-2,6%, de los cuales aproximadamente un 75% de los casos presentaran infección persistente por el mismo^{3, 4, 5, 6, 7}. Por tanto, el número de personas infectadas por este virus en España estará entre 500.000 y 700.000 (FIGURA 1)

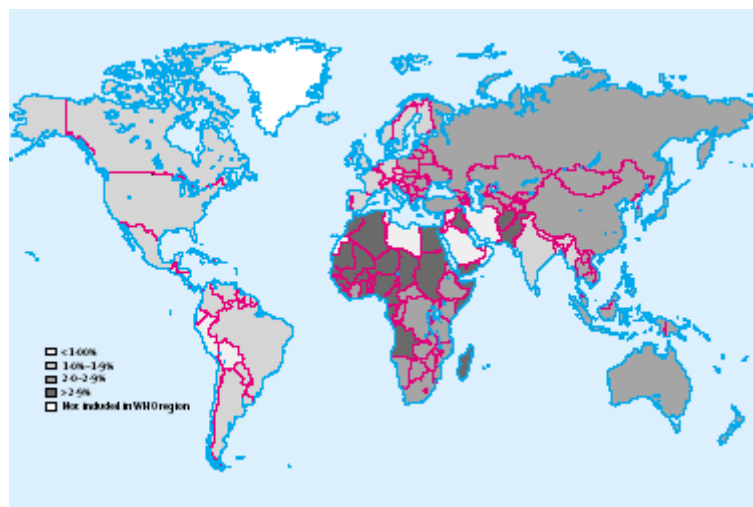


FIGURA 1.- Prevalencia estimada de la infección por VHC

En la actualidad la cirrosis por VHC es la indicación más frecuente de trasplante hepático⁸ y se estima que es el causante de la mitad de los casos de hepatocarcinoma⁹,¹⁰.

Se calcula que la infección por VHC origina una disminución de la expectativa de vida en torno a 8-12 años en los pacientes infectados, así como una importante disminución en la calidad de vida¹¹.

2.- CARACTERISTICAS DEL VIRUS

El VHC es un virus RNA de cadena simple, de unos 9.500 nucleótidos, que nunca pasa en su ciclo celular por fase de ADN. Pertenece a la familia de los Flaviviridae, género Hepacivirus¹²

Este virus se transmite fundamentalmente vía parenteral. La mayoría de los pacientes infectados en Estados Unidos y Europa han adquirido la enfermedad a través del consumo de drogas intravenosas¹³ o mediante transfusión de sangre o derivados¹⁴, aunque el riesgo de transmisión actual por esta última vía disminuyó mucho al introducirse el cribado sistemático de la sangre para VHC en 1990¹⁵, siendo en la actualidad prácticamente nulo (aproximadamente 1 caso por millón de transfusión) desde la determinación del RNA viral en las muestras de suero mediante tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (HCV-NAT) introducida en España en 2003, que permite identificar los casos existentes en periodo ventana¹⁶.

Otros mecanismos de transmisión del virus son: transmisión perinatal¹⁷, infección nosocomial^{18, 19}, hemodiálisis²⁰ y transmisión sexual²¹.

3.- HISTORIA NATURAL

Tras la infección aguda por el virus, este se cronifica en un 50-85% de los casos^{22, 23}, existiendo una serie de factores que condicionan el riesgo de cronificación, como son la edad del paciente en el momento de contraer la infección, sexo, raza, desarrollo de síntomas en la infección aguda^{24, 25, 26, 27, 28}.

La hepatitis crónica progresa a cirrosis en aproximadamente un 20% de los casos, en un periodo de tiempo medio de 15-25 años. Dicha progresión también viene determinada por varios factores: edad, sexo, raza, coinfección por otros virus, enfermedades asociadas....^{29,30, 31, 32, 33}.

Una vez desarrollada la cirrosis, existe un riesgo de descompensación de la misma de un 20-30% a los 10 años, con una disminución de la supervivencia hasta el 50% a los 5 años cuando sucede la descompensación^{34, 35, 36}.

Por otro lado, una vez desarrollada la cirrosis, existe un riesgo del 1-4% anual de aparición de hepatocarcinoma³⁷, con la morbi-mortalidad que ello conlleva.

4.- PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR VHC

4.1.- Ciclo vital del virus

Los mecanismos de entrada del VHC en el hepatocito no están aún bien definidos. Se han identificado una serie de receptores, probablemente involucrados en la unión del virión a la superficie celular, que facilitan su entrada (CD81, CD151, scavenger-receptor tipo I clase B (SR-B1), receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL), lecitina tipo L-SIGN, receptor de asialoglicoproteínas, heparan sulfatos, claudina-1...) ^{38, 39, 40}.

De ellos, el r-LDL parece tener una gran importancia en la entrada del virus, mientras que CD81 y SR-B1 actuarían como cofactores.

Tras la adhesión a la membrana celular, se produce la entrada del virus en la célula. Después de entrar en la célula, la nucleocápside del virus pasa al citoplasma celular, donde el RNA viral actúa directamente como RNA mensajero, para la traslación de una larga poliproteína. La replicación viral ocurre en el citoplasma a partir del mismo molde de RNA mediante una RNA polimerasa sin actividad de “proof-reading”, liberándose los viriones posteriormente mediante exocitosis tras el acoplamiento entre las proteínas virales y el RNA viral.

4.2.- Mecanismos de daño hepático y control viral

El VHC no parece tener un efecto citopático directo, sino que el daño celular vendría mediado por la respuesta inmune del huésped frente a determinados antígenos virales,

reconocidos en presencia del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA), que condicionaría la lisis de los hepatocitos infectados⁴¹ y la eliminación del VHC.

4.3.- Mecanismos de respuesta inmune frente al virus

4.3.1- RESPUESTA INMUNE INNATA

La resolución o cronificación de la infección por VHC se determina precozmente^{42, 43}.

La primera línea de defensa consiste en la producción de interferones y otros mediadores inflamatorios por los hepatocitos infectados, tras la activación de PRR (pattern recognition receptors), presentes en la superficie del hepatocito, que son activados por la presencia de RNA de cadena simple (RNAss) y RNA de doble cadena (RNAds)⁴⁴.

Por tanto los PRR, entre los que destacan los Toll like receptors (TLR) y RNA-helicase receptors (RIG-I-like receptors), son esenciales en el reconocimiento del RNA viral, y en el desarrollo de una adecuada inmunidad antiviral^{45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52}.

La activación de estos receptores induce la producción de mediadores inflamatorios e interferones (IFN), que por un lado disminuyen la replicación viral y por otro inducen la activación de las diferentes células del sistema inmune innato (FIGURA 2)^{53, 42, 43, 54, 55,}

⁵⁶.

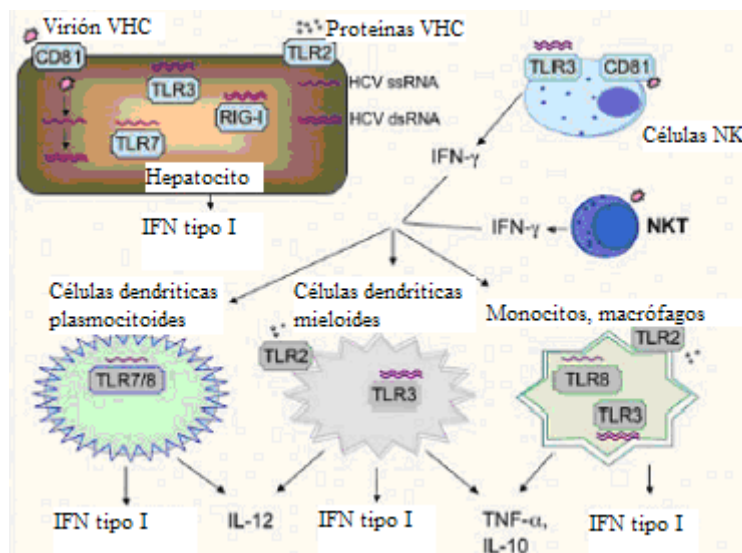


FIGURA 2 . Implicación de los diferentes tipos de células inmunes en el reconocimiento y eliminación del VHC.

Sin embargo el VHC ha desarrollado múltiples mecanismos defensivos para evitar esa activación^{43, 57, 58, 59, 60, 61}. Este virus no solo interfiere sobre la activación de los TLR, sino que también lo hace sobre la mayoría de las vías de actuación de los interferones^{62, 63, 64}. Además, se ha visto que el VHC altera el funcionamiento de las diferentes células del sistema inmune innato: células dendríticas (CD), monocitos, macrófagos, natural Killer (NK) y natural Killer T (NKT) a través de diferentes mecanismos⁶⁵⁻⁹⁸

4.3.2.- RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA

RESPUESTA CELULAR

La respuesta celular específica es esencial en el control de una infección viral no citopática. Esta respuesta está compuesta por dos tipos celulares: células T CD4+ colaboradoras y células T CD8+ citotóxicas.

Las células T colaboradoras, caracterizadas por expresar la molécula CD4 y por reconocer los antígenos virales en el contexto de los complejos mayores de histocompatibilidad de clase II, son esenciales para la correcta activación de las células citotóxicas y de las células B. Para favorecer la activación adecuada de las células B y T citotóxicas, las células T colaboradoras deben secretar las citoquinas adecuadas tras ser activadas por las células presentadoras de antígeno (CPA).

Los linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos deben ser activados por las células presentadoras de antígenos profesionales a nivel de los órganos linfoides primarios mediante la presentación de los epítomos virales por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, en presencia de un correcto ambiente de citoquinas y moléculas coestimuladoras.

La activación de estas células T (colaboradoras y citotóxicas) depende de la acción de 2 señales (FIGURA 3):

- Interacción entre el receptor de la célula T (RCT) y el complejo mayor de histocompatibilidad de la célula presentadora de antígeno que presenta el epítomo viral correspondiente.
- Interacción entre moléculas co-estimuladoras presentadas por las células T y sus receptores, expresados en la CPA.

Existen moléculas co-estimuladoras positivas, como el CD28, que, tras la unión a su receptor (CD80), induce la activación celular. Tras este proceso se estimula la expresión de moléculas co-estimuladoras negativas, como PD1 o CTL4A, que se unen a sus ligandos (PDL1 y CD86) induciendo anergia celular. Este

mecanismo inductor de anergia permite desactivar a la célula T una vez a realizado su función.

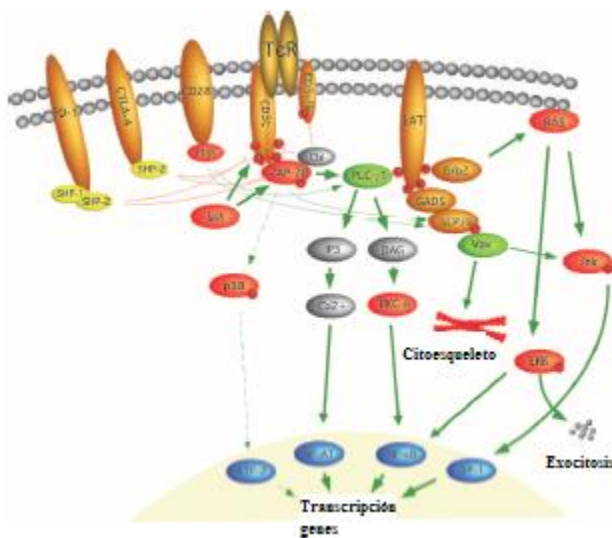


FIGURA 3: RECEPTOR DE CELULA T

Las vías de activación están marcadas con líneas gruesas.

Los mecanismos reguladores están marcados con flechas finas rojas (inhibidores) o verdes (estimuladores).

Tras el reconocimiento específico del antígeno viral, los LTC se activan, formando agregados linfoides, y se unen a determinadas células, entre las que destacan las células endoteliales, activadas por citoquinas liberadas en el contexto del proceso inflamatorio, que expresan en su superficie determinadas moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), que facilitan el reclutamiento y migración de las células desde el espacio intravascular hacia las zonas inflamadas. Dicha migración viene facilitada por el desarrollo de neoangiogénesis a nivel portal y periportal, desencadenada por la respuesta inflamatoria⁹⁹.

La migración de los linfocitos T a nivel intrahepático se completa por el gradiente de quimioquinas secretadas por los hepatocitos infectados, como CXCL10 y CCL3, que atraen a los linfocitos T que expresan los correctos receptores de quimioquinas como CCR5 o CXCR3. Tras la atracción de los linfocitos T citotóxicos VHC específicos al parénquima hepático, estas células reconocen a los antígenos virales expresados en la superficie celular de los hepatocitos infectados, en asociación con moléculas del HLA-I

(fenómeno de restricción inmune), desencadenando los procesos de lisis celular y producción de citoquinas tipo I.

La magnitud (número de células T específicas activadas) y variedad (multiespecificidad de las mismas) son determinantes en la posibilidad de aclaramiento viral ^{100,101,102}.

La eliminación del VHC se efectúa por medio de 2 mecanismos:

- Mecanismos citolíticos:

Apoptosis, en la que dicha membrana se mantiene intacta¹⁰³. La apoptosis celular está mediada por dos vías ^{104, 105, 106, 107, 108} (FIGURA 4):

- Liberación de proteasas (perforina, granzima) por los gránulos citotóxicos de los linfocitos T activados.
- Expresión de Fas ligando en la superficie de los linfocitos T citotóxicos al activarse, que interacciona con el Fas-Receptor presente en la superficie celular del hepatocito.

Ambas vías activan una cascada, mediada por enzimas, que facilitan la destrucción de los hepatocitos infectados.

- Mecanismos no citolíticos:

Los linfocitos T activados secretan TNF alfa e interferón gamma, que actúan directamente sobre las partículas virales, destruyendo el VHC sin producir daño hepático. Este es el mecanismo principal de control viral durante la infección por VHC.

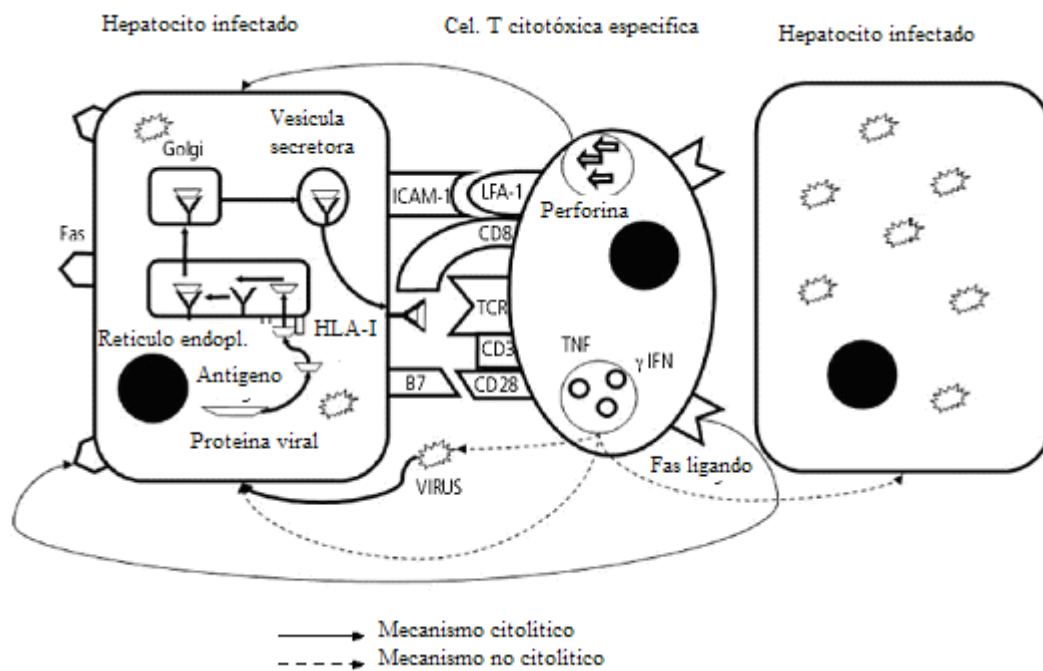


FIGURA 4.- Interacción entre el linfocito T citotóxico y el hepatocito infectado.
 — Mecanismos citolíticos de control viral basados en la acción de la perforina y en la interacción Fas-FasL.
 - - - Mecanismos no citolíticos de control viral mediante la producción de citoquinas tipo I.

El papel de las células T en la fase crónica de la enfermedad está menos aclarado, debido a la capacidad del virus para escapar a la respuesta inmune, mediante el desarrollo de quasiespecies¹⁰⁹ y la producción de mutaciones de escape en los epítomos presentados por las CPA¹¹⁰. No obstante, durante la infección persistente la respuesta celular citotóxica se caracteriza por presentar un estado de anergia, ser oligoclonal y oligoespecífica.

RESPUESTA HUMORAL.

La respuesta humoral es muy eficaz en la neutralización de infecciones no citopáticas como la producida por el virus de la hepatitis B. Sin embargo, la producción de anticuerpos frente al VHC no es capaz de proteger al huésped frente al virus^{111, 112} ya que:

- Por razones aún mal conocidas se desarrolla tarde tras la infección aguda (periodo medio de seroconversión > 40 días).
- Debido a la amplia variabilidad del virus, que origina una amplia diversidad de quasiespecies, el VHC es capaz de evadir la respuesta inmune humoral.

5.- PAPEL DE LAS QUIMIOQUINAS EN LA HEPATITIS CRONICA POR VHC

CITOQUINAS

Las citoquinas (CK) son pequeñas proteínas solubles secretadas por múltiples células (inmunes y no inmunes) y constituyen un sistema de comunicación intercelular. Actúan de forma autocrina o paracrina mediante la unión a receptores específicos de las células, induciendo diferentes mecanismos de activación e inhibición celular¹¹³.

Se han descrito más de 100 citoquinas diferentes, clasificadas en varios grupos según su función principal. La nomenclatura de las citoquinas refleja la primera función que se describió al descubrir la molécula, así como el orden cronológico de los descubrimientos, clasificándose en 6 grupos principales:

- Interleuquinas (IL1, IL2, IL3...).
- Interferones (alfa, beta, gamma).
- Factores de necrosis tumoral (TNF-alfa, TNF-beta).
- Factores estimuladores de formación de colonias (G-CSF, GM-CSF, M-CSF..).
- Factores de crecimiento (EGF, MGF...).
- Quimioquinas (QQ).

Estas proteínas están involucradas en todas las facetas de la respuesta inmune, regulando la misma. La combinación de citoquinas que se produzca ante un

determinado estímulo antigénico condicionará el tipo de respuesta inmune que se desarrollará frente a dicho estímulo.

Un subgrupo muy importante de citoquinas lo constituyen las quimioquinas, pequeñas proteínas (8-14Kda) cuya función principal es regular el tráfico de las células del sistema inmune en el cuerpo, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas^{114, 115}.

Las quimioquinas contribuyen al desarrollo de una adecuada respuesta inmune en los órganos diana, pero también participan en la patogénesis de la inflamación^{116, 117}. Además, intervienen en otros procesos, como la angiogénesis, hematopoyesis, desarrollo de órganos linfoides, cicatrización y el desarrollo embrionario¹¹⁸.

Se han descrito aproximadamente 50 quimioquinas, subdivididas en 4 familias en función de la posición de 2 cisteínas de su porción N-terminal: CXC, CC, C, CX3C^{119, 120}. La familia CXC se subdivide en 2 grupos en función de la presencia de la triada Glu-Leu-Arg precediendo a la primera cisteína: ELR-CXC y no-ELR-CXC.

Las quimioquinas inducen la migración celular mediante la unión a receptores específicos, los receptores de quimioquinas (RQ), expresados en la superficie de las células inmunes. A menudo un receptor puede interactuar con distintos ligandos (TABLA 1).

Quimioquina	Receptor	PMN	Mo	mDC imm	mDC mat	pDC	NK	NKT	B cell	T naïve	T mem	Th1	Th2	Th17	T reg	Linfocitos intrahepáticos
CXCL6	CXCR1	x	x													
CXCL7																
CXCL8																
CXCL1																
CXCL2	CXCR2	x	x													
CXCL3																
CXCL5																
CXCL9																
CXCL10	CXCR3							x		x	x	x			(*)	CD4, CD8, NKT
CXCL11																
CXCL12	CXCR4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	CD4, CD8, NKT
CXCL13	CXCR5								x							
CXCL16	CXCR6						x	x		x	x			x		CD4, CD8, NK, NKT
CCL23	CCR1															
CCL14																
CCL15			x				x				x	x				
CCL16																
CCL13																
CCL7	CCR2															
CCL3			x			x				x						(CD4)
CCL5	CCR5															
CCL2				x		x	x	x		x	x				x	CD4, CD8, NKT, NK
CCL8	CCR4															
CCL17																
CCL22																
CCL20				x					x		x			x		CD4, (NKT)
CCL19	CCR7															
CCL21					x				x	x	(*)	x	x		x	CD8
CCL1	CCR8		x				x								x	
CCL25	CCR9										x			x		
CCL27	CCR10															
CCL28											x				(*)	
XCL1	XCR1						x									
XCL2	CX3CR1															
CX3CL1		x	x				x					x				CD4, (NKT)

TABLA I: Tipos de quimioquinas y sus receptores en las distintas células del sistema inmune

La activación del receptor de quimioquinas desencadena una cascada de activación celular^{121, 122} que incluye la generación de inosiltrifosfato, liberación de calcio intracelular y activación de protein-kinasa C. Asimismo se activan pequeñas proteínas de la familia Ras y Rho, relacionadas con los procesos de movilidad celular, lo cual facilita el desplazamiento de las células en la dirección apropiada.

Estos receptores se expresan en diferentes tipos de leucocitos. Algunos de ellos se expresan de manera permanente, mientras que otros se inducen en función del grado de activación y diferenciación leucocitaria¹²³. Se ha demostrado además que la expresión de determinados receptores depende del perfil de producción de citoquinas¹²⁴.

Existen dos tipos de quimioquinas^{125 126}:

- Quimioquinas homeostáticas (p.e. CXCL12, CCL21, CCL19), encargadas de guiar el tráfico y la retención de los leucocitos específicos a través de los distintos componentes tisulares, bajo condiciones fisiológicas.
- Quimioquinas inflamatorias, (p.e. CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10), cuya producción se induce en respuesta a una señal infecciosa, inflamatoria o inmunológica. Su función es regular el reclutamiento de células efectoras específicas a las zonas inflamadas.

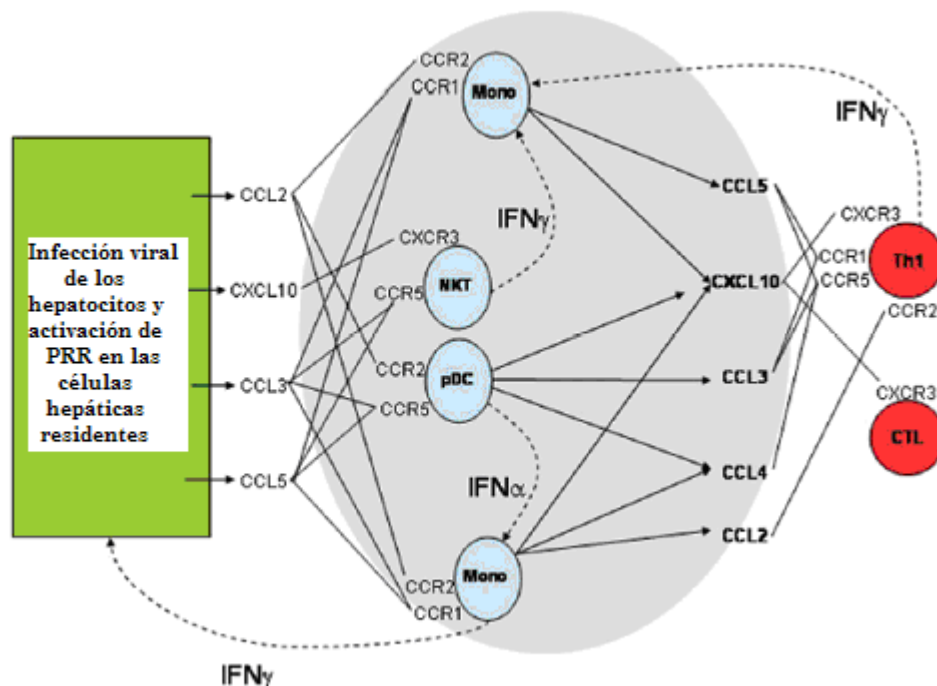


FIGURA 5: Una compleja red de interacciones autocrinas y paracrinas afectando a distintas células determina el ambiente de quimioquinas en el hígado del paciente VHC, seleccionando que leucocitos son reclutados al mismo.

5.1.- Papel de las citoquinas en la respuesta inmune innata frente al virus.

Las quimioquinas se secretan precozmente tras la infección mediante la activación de los PRR de células epiteliales, estromales e inmunes, reclutando inicialmente las células de la respuesta inmune innata (neutrófilos, monocitos, NK y NKT), que expresen los apropiados receptores de quimioquinas (FIGURA 5).

La infección de los hepatocitos por parte del virus activa la secreción de citoquinas, fundamentalmente interferones tipo I^{127, 128}, lo que estimula el reclutamiento de las células del sistema inmune. Así, se ha observado que las proteínas del VHC del core, NS4A, NS4B y NS5A inducen la secreción de citoquinas in vitro, alguna de las cuales interfieren con la respuesta inmune^{129,130, 131}. Se ha visto que proteínas del VHC inducen la producción de CXCL8 a nivel de células estrelladas, hepatocitos, macrófagos y células endoteliales^{132, 133, 134} y que la concentración elevada de estas quimioquinas inhiben la actividad antiviral del interferón¹³⁵.

La primera línea de defensa del huésped tras la liberación de partículas virales a la circulación está constituida por las células NK y NKT, muy abundantes en el hígado¹³⁶. Estas células se activan por la producción de citoquinas antivirales como el IFN tipo I (alfa y beta), producido por los hepatocitos infectados. Las células NK también se activan por la liberación de IL-12, por las células dendríticas.

Las células NK y NKT tienen una doble labor:

- Actividad citolítica no restringida, de las células infectadas y CD inmaduras (sin perfil de citoquinas Tc1), inadecuadas para una correcta estimulación de la

respuesta específica¹³⁷. La funcionalidad de estas células condiciona la maduración parcial o total de las CD en función del balance de citoquinas en el que se activan las células NK y NKT (IL-4, IFN alfa, IL-12)¹³⁸.

- Producción, a su vez, de determinadas citoquinas (IFN gamma, TNF alfa)¹³⁹. Estas citoquinas inhiben la replicación viral por mecanismos no citolíticos, es decir, eliminan el virus sin destruir el hepatocito.

La migración de las células NK al hígado viene mediada por la interacción de CXCL16 con su receptor específico, CXCR6, presente en estas células, permitiendo su reclutamiento y supervivencia, lo cual mantiene niveles elevados de IFN gamma, que facilita el reclutamiento de células asociadas a respuesta Th1¹⁴⁰. Otras quimioquinas, como CCL2 y CCL3 también están implicadas en el reclutamiento de las células del sistema inmune innato al hígado¹⁴¹.

Las CD captan las partículas virales por medio de los TLR, activándose y secretando varios tipos de citoquinas en función del tipo de CD. Existen dos tipos^{142, 143}:

- CD mieloides (mCD), que producen principalmente IL12 o TNF alfa.
- CD plasmocitoides (pCD), que producen IFN alfa.

Dichas células son capaces de procesar los antígenos virales y presentarlos a las células del sistema inmune específico, a través de moléculas de HLA tipo I y II.

La migración de las CD también viene mediada por quimioquinas, habiéndose observado una expresión de los receptores CCR2, CCR5 y CXCR3 en las pCD, lo cual permite su migración al hígado inflamado.

5.2.- Papel de las citoquinas en la respuesta inmune específica

Tras su activación y maduración, las CD abandonan el hígado y se dirigen a los ganglios linfáticos para activar allí las células T del sistema inmune específico¹⁴⁴. La atracción de las CD hacia el ganglio linfático también está mediada por quimioquinas (CCL21 y CCL19), que interaccionan con su receptor (CCR7), sobreexpresado en la superficie de las CD maduras. Dicho receptor también se expresa en las células naive B y T¹⁴⁵, lo cual permite que CD y linfocitos se encuentren en el ganglio linfático, para la activación de estos últimos^{146, 147, 148}.

En el ganglio linfático se realiza la activación de las células T específicas, a través de la interacción entre determinados epítopos virales (presentados por las CPA en los complejos mayores de histocompatibilidad) y el receptor de la célula T (RCT) adecuado (FIGURA 6).

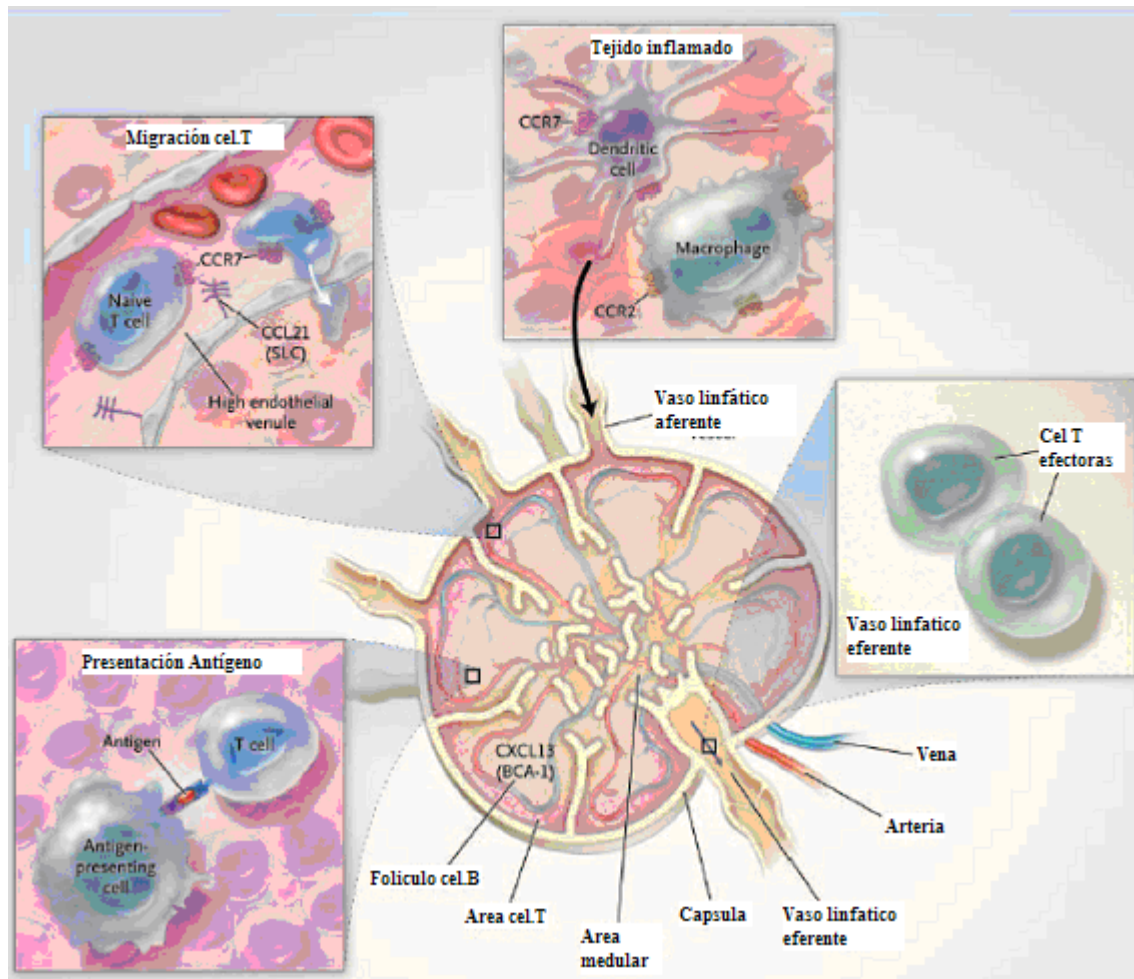


FIGURA 6.- Desplazamiento de las células inmunes a través del ganglio linfático

Las células T naive, expresando CCR7, entran en el ganglio a través de vénulas endoteliales, que expresan la quimioquina CCL21. Las células dendríticas y macrófagos entran a través de los linfáticos aferentes. Las CD maduras expresan CCR7 y los macrófagos CCR2. Las células T y CD se juntan en base a un gradiente de CCR7. La presentación del antígeno activa las células T, saliendo las células efectoras a través de los linfáticos eferentes tras la pérdida de la expresión de CCR7.

Las células B acuden a los folículos, donde está presente CXCL13 (quimioatrayente de células B)

Una vez activadas en el ganglio linfático, las células T se convierten en células efectoras, pierden el receptor CCR7 y expresan otros receptores de quimioquinas, cuya activación estimula la migración de dichas células al tejido inflamado. Las células T CD8 específicas adquieren en el ganglio linfático capacidad citolítica y de secreción de citoquinas tipo I, mientras que las células CD4 específicas se activan para regular la respuesta adaptativa, secretando citoquinas tipo Th1 (IL-2, IFNgamma y TNF alfa) para

favorecer la respuesta citotóxica y citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) para regular la respuesta humoral.

La interacción célula presentadora de antígeno-virus y el receptor de célula T viene regulada por una serie de moléculas coestimuladoras positivas y negativas y un determinado ambiente de citoquinas, que condiciona el desarrollo de una respuesta tipo Th1 (mediada por IL-2, IFN gamma y TNF alfa), tipo Th2 (IL-4, IL-10, IL-13)^{149, 150, 151, 152} o tipo Th17 (IL17, IL22, IL23)^{153, 154}.

Determinados receptores, como CCR5 y CXCR3 se asocian a una respuesta celular tipo 1, mientras que otros receptores (CCR4 y CCR8) se asocian con respuesta tipo 2. Finalmente, la respuesta Th17 viene mediada por los receptores (CCR6 y CXCR6)¹⁵⁵⁻¹⁶⁰.

El desarrollo de una respuesta inmune específica policlonal, multiespecífica, capaz de secretar citoquinas tipo I, y que exprese quimioquinas asociadas a Th1/Tc1, se asocia al control de la infección. En caso contrario se desarrolla una respuesta ineficaz para eliminar el virus, que condicionara un daño hepático progresivo¹⁶¹.

6.- QUIMIOQUINAS ASOCIADAS A RESPUESTA Th1/Tc1

La respuesta Th1 viene mediada por las quimioquinas del grupo no-ERL-CXC y CC, cuyos receptores están presentes en las células inflamatorias tipo Th1/Tc1.

6.1.- QUIMIOQUINAS no-ERL-CXC:

Interaccionan con el receptor de quimioquinas CXCR3, presente en las células NK, células T de memoria y efectoras asociadas a respuesta Th1/Tc1 y T reguladoras. A este grupo pertenecen:

- CXCL10

También denominada IP-10 (interferón gamma inducible protein 10), es la quimioquina estudiada más extensamente en relación con el VHC. Su producción es inducida por interferón gamma a nivel de células mieloides, células mononucleares, fibroblastos y células endoteliales ¹⁶². Además del IFN-gamma existen otros estímulos que elevan esta quimioquina durante la infección o inflamación (IFN tipo I, TNF alfa, dsRNA, lipopolisacarido (LPS), ciertos virus...) ¹⁶³⁻¹⁶⁹.

En los pacientes con VHC la expresión de CXCL10 está aumentada en hígado y sangre periférica ^{170,171, 172}. A nivel intrahepático CXCL10 es producido por los hepatocitos y/o células endoteliales sinusoidales ^{173, 174, 175}. Los niveles de CXCL10 en sangre periférica se correlacionan con el grado de necroinflamación en pacientes con VHC ^{176, 177}.

Asimismo los niveles de CXCL10 intrahepáticos están estrechamente relacionados con la inflamación lobular, pero no con la inflamación portal o fibrosis, lo que sugiere que las células T inflamatorias intralobulares pueden ser atraídas al hígado por CXCL10.

Podría existir una correlación entre los niveles de CXCL10 previos al tratamiento antiviral y la respuesta al mismo, así como un descenso de estos niveles a rangos normales en pacientes con respuesta virológica sostenida al tratamiento, al contrario de lo que sucedería en los no respondedores ^{178, 179, 180}, lo cual habla a favor del papel de esta quimioquina como factor pronóstico de respuesta a tratamiento antiviral, aunque esto debe ser confirmado con series más amplias.

- CXCL9:

También denominado Mig (Monokine induced by interferón gamma) es principalmente un quimioatrayente de células T activadas.

Aunque su estímulo más potente es IFN-gamma, existen otros inductores de su secreción, como IFN tipo I o virus influenza A ¹⁸¹⁻¹⁸⁵.

En los pacientes VHC+ la expresión de CXCL9 en sangre periférica e intrahepática está aumentada en comparación con personas no infectadas. A nivel intrahepático CXCL9 se detecta fundamentalmente en las células endoteliales sinusoidales, tanto en pacientes sanos como infectados, aunque la expresión es mucho mayor en pacientes infectados, pudiendo existir una correlación con el grado de inflamación ¹⁸⁶⁻¹⁸⁹.

- CXCL11:

También denominada I-TAC (interferón inducible T-cell alfa chemoattractant). Su producción se induce fundamentalmente por IFN gamma y, en menor grado, por IFN tipo I, a nivel de diferentes tipos celulares, incluyendo monocitos, macrófagos y astrocitos.

Esta quimioquina atrae células T activadas a través de su interacción con CXCR3, presentando una mayor afinidad por este receptor y una mayor potencia quimioatrayente que CXCL9 y CXCL10.

En el hígado de pacientes sanos la expresión de CXCL11 está localizada predominantemente en las células endoteliales sinuoidales, mientras que en los pacientes infectados por VHC es producido principalmente por los hepatocitos¹⁹⁰.

Los niveles intrahepáticos de CXCL11 están significativamente aumentados en pacientes con infección crónica por VHC, en relación con hígados sanos, existiendo una correlación entre el grado de expresión de esta quimioquina a nivel intrahepático y la inflamación lobular.

Además de su papel en la inflamación esta quimioquina podría contribuir a una susceptibilidad aumentada a la infección por VHC, habiéndose descrito una variante polimórfica de CXCL11 en pacientes infectados por VHC, que podría estar en relación con un aumento de la susceptibilidad a la infección por este virus en pacientes portadores de la mutación¹⁹¹.

6.2.- QUIMIOQUINAS CC:

- CCL5:

También llamada RANTES (Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted). Regula la migración de células T de memoria, monocitos, basófilos, eosinófilos, células NK y células dendríticas, aunque las células T de memoria son las que tienen una mayor afinidad por esta quimioquina^{192, 193}.

Es producida por fibroblastos, linfocitos T, monocitos, macrófagos y células epiteliales en respuesta a varios estímulos (TNF alfa, VHC, otros virus)¹⁹⁴⁻²⁰⁰. CCL5 interacciona con varios receptores: CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5^{200, 201, 202, 203}.

La expresión intrahepática de esta quimioquina se ha observado en diferentes tipos celulares, incluyendo hepatocitos, células endoteliales sinusoidales y epitelio biliar, estando aumentada su expresión intrahepática en pacientes con infección crónica por VHC en relación con personas no infectadas^{204, 205}, existiendo una correlación entre el grado de expresión de CCL5 y el grado de inflamación hepática^{206, 207}.

- CCL3-CCL4:

También llamados macrophage inflammatory protein 1 alfa y beta (MIP 1 alfa y beta). Estas quimioquinas están expresadas a niveles bajos en monocitos, macrófagos, linfocitos B y T y células NK²⁰⁸. Tras la estimulación con lipopolisacárido, IL-1, IFN-alfa o IFN gamma se induce su expresión en otras células como células del músculo liso vascular²⁰⁹ y microglia²¹⁰. La producción de CCL3 también puede ser inducida en células epiteliales, fibroblastos, células mesangiales y astrocitos²¹¹⁻²¹⁵. Algunos virus, como el virus influenza A o virus Sendai también inducen la expresión de estas quimioquinas²¹⁶.

CCL3 y CCL4 son potentes quimioatrayentes de los linfocitos T, células NK, monocitos y células dendríticas inmaduras²¹⁷⁻²²¹, mediante la interacción con sus receptores específicos, principalmente CCR5 y, en menor grado, CCR1, CCR2 y CCR3.

En la mayoría de los estudios se ha observado un incremento de estas quimioquinas en suero e hígado de pacientes infectados por VHC, aunque su localización celular, determinada por inmunohistoquímica, ha variado en los diferentes estudios.

6.3.- IMPORTANCIA DE LAS QUIMIOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA

Las citoquinas de la respuesta inmune innata son los inductores más potentes de las quimioquinas inflamatorias. Los interferones tipo I, TNF alfa e IL-10 estimulan la expresión de CCL3, CCL4 y CCL5^{222, 223, 224}, que se unen a los receptores de

quimioquinas CCR5 y CCR1, presentes en las células T activadas. Por otro lado, los interferones tipo II inducen la expresión de CXCL9 y CXCL10, que se unen a CXCR3, presente en células T activadas y NK ²²⁵. Todo ello permite la migración hacia el órgano infectado de una respuesta inmune específica tipo Th1/Tc1, efectiva para el aclaramiento viral. Los linfocitos B también expresan CXCR5 que, en presencia de su ligando CXCL13 estimulan la migración de dichas células a los folículos linfoides²²⁶.

Las células T reguladoras, que también participan en la modulación de la respuesta inmune específica, expresan en ganglio linfático y sangre periférica CCR4, CCR5 y CCR6, mientras que en hígado expresan CXCR3 y, en algunas situaciones, CXCR6 y CCR10 ²²⁷.

Durante el proceso de activación de las células T virus-específicas presentan diferentes fenotipos con diferentes capacidades. Estos fenotipos se caracterizan por la distinta expresión de CCR7. La célula naive expresa CCR7 lo que le permite migrar al ganglio linfoide. Tras su activación pasa a célula efectora perdiendo la expresión de CCR7. Sin embargo alguna de estas células recupera la expresión de CCR7, formándose un reservorio de células T de memoria central CCR7+, que circulan a través de los tejidos linfoides, y están preparadas para responder rápidamente ante el encuentro con el antígeno²²⁸. El receptor de quimioquinas CCR7 tiene propiedades reguladoras, siendo necesaria su presencia para la migración de las células efectoras fuera del tejido durante la resolución de la infección²²⁹.

Por tanto las quimioquinas son esenciales para el inicio, mantenimiento y resolución de la respuesta inmune, siendo fundamentales en la patogenia de la infección por VHC.

7.- MECANISMOS DEL VHB PARA EVADIR LA RESPUESTA INMUNE

Más de 500 millones de personas en el mundo presentan infección crónica por VHB y/o VHC , encontrándose en riesgo de desarrollar enfermedad hepática crónica, cirrosis y cáncer hepático.

Ambos virus se transmiten vía parenteral, sexual y perinatal. Aunque los dos inducen el daño hepático agudo y crónico por un mecanismo inmune, la historia natural y el pronóstico difiere mucho entre ellos, de modo que la infección por VHB presenta un bajo riesgo de cronificación cuando se adquiere en la edad adulta²³⁰, mientras que el VHC se cronifica en el 75-80% de los adultos infectados²².

En los últimos años, gracias a la posibilidad de utilizar modelos animales y la existencia de otros virus con características similares al VHB y VHC ^{231, 232}, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la patogenia de estas infecciones.

Así, aunque tanto el VHB como el VHC son virus hepatotropos, que inducen la aparición de enfermedad hepática aguda y crónica, ambos virus difieren marcadamente en el modo en que interactúan con el sistema inmune del huésped, lo cual se traduce en que la infección por VHB se controle en la mayoría de los pacientes infectados en la edad adulta (siendo mucho mayor el riesgo de cronificación en neonatos, que aún no han desarrollado completamente su sistema inmune), mientras que la infección por VHC presenta un alto índice de cronificación, condicionado por la interferencia del virus con el sistema inmune del huésped a varios niveles ²³³⁻²⁶⁸ (FIGURA 7).

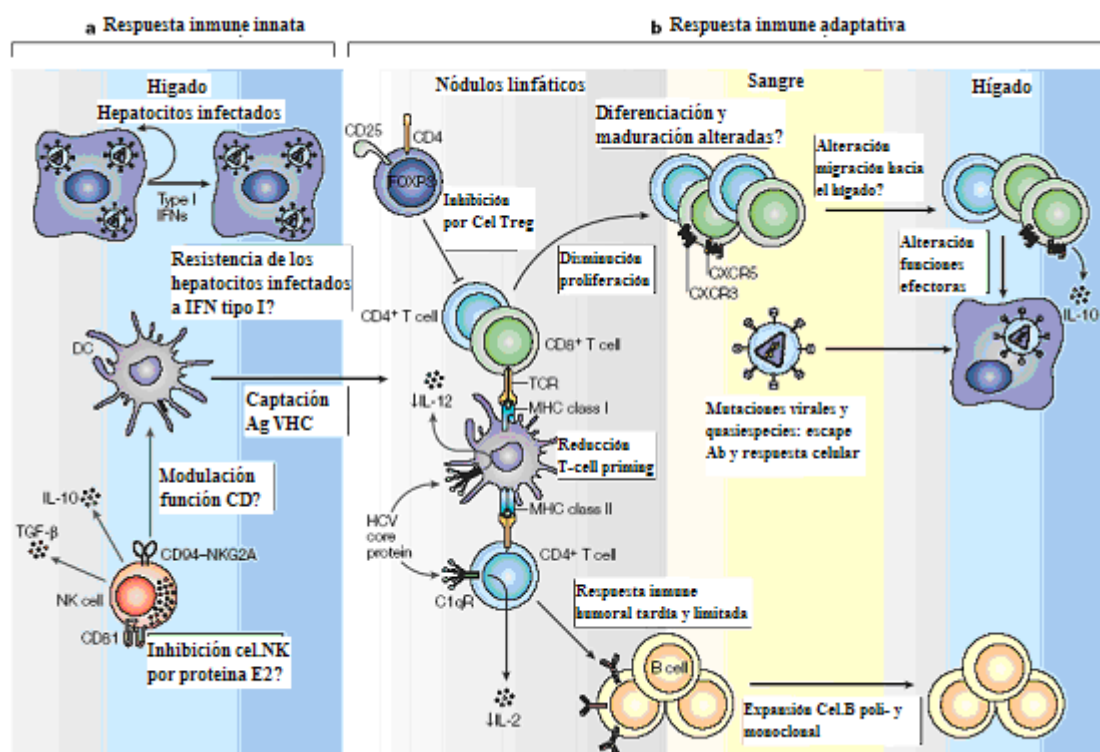


FIGURA 7.- Mecanismos de interferencia del VHC con el sistema inmune del huésped

a.- Respuesta innata: Se ha observado que los niveles intrahepáticos de IFN tipo I no se correlacionan con el pronóstico de la infección, indicando que el VHC no es sensible a estos IFN in vivo.

Estudios in vitro muestran que las NK de pacientes sanos pueden ser inhibidas por altas concentraciones de proteína E2 del VHC y que las NK de pacientes infectados están alteradas en su capacidad de producción de citoquinas y activación de CD

b.- Respuesta adaptativa: Existe un escape viral a través de mutaciones en epítomos de las células T y B. La respuesta humoral aparece tarde tras la infección y no protege frente a reinfecciones.

Las células T VHC-específicas están menos diferenciadas que las células T específicas frente a otros patógenos y parecen tener alteradas sus funciones efectoras. Dicha alteración podría estar influida por una menor activación celular secundaria a una alteración del funcionamiento de las CD e inhibición de macrófagos, CD y células T mediante la unión de la proteína del core al receptor C1q del complemento. Además se han detectado recientemente en pacientes con infección por VHC células T periféricas CD4⁺ CD25⁺ (Células T reguladoras) y las células T CD8⁺ productoras de IL10, ambas con funciones reguladoras, cuyo papel en la cronificación aún no está completamente aclarado.

Por último, a pesar de la existencia precoz de niveles altos de virus, las células T VHC-específicas aparecen tardíamente, lo que podría indicar una alteración en la migración de estas células determinada por el virus.

CXCR: Receptor de CXC; FOXP3, forkhead box P3; NKG2A, NK grupo 2; TCR: receptor de células T; TGF- β , transforming growth factor- β .

Muchos de estos mecanismos de evasión de la respuesta inmune vienen mediados por proteínas del virus. La alteración de la respuesta inmune mediada por el VHC se produce a distintos niveles:

7.1.- Alteración de la respuesta innata

- **Producción de IFN tipo I.**

Se ha observado in-vitro que el VHC es capaz de bloquear la producción de IFN tipo I (alfa y beta). Sin embargo, in vivo, el VHC es un buen inductor de la expresión de estos interferones, probablemente por tratarse de un virus que replica vía intermediarios formados por dsRNA. Estos intermediarios activan el aparato celular dsRNA sensible, induciendo la expresión de interferones tipo I, que están muy aumentados durante las primeras fases de la infección, si bien el virus parece desarrollar resistencia a los mismos, a través de varios mecanismos:

1. Inducción por proteínas del virus (NS5A) de la expresión de IL-8 que inhibe la acción del IFN alfa²⁶⁹
2. Bloqueo de la señalización de TLR-3 por la proteína NS3/4A del VHC²⁷⁰
3. Inhibición de protequinasas mediada por E2 y NS5A.

- **Bloqueo de las células NK y NKT**

Las células NK y NKT desempeñan un papel central en la respuesta inmune frente a distintos virus (p.e. citomegalovirus murino), desarrollando su actividad por mecanismos citotóxicos directos no restringidos por HLA y mediante la producción de citoquinas tipo I (interferon gamma)²⁷⁰.

Además las NK y NKT actúan regulando la maduración de las CD, fundamentales en el desarrollo de respuesta Th1/Tc1, necesaria para el aclaramiento del virus.

Sin embargo, en la infección por VHC estas células no parecen jugar un papel importante^{270, 271}, probablemente por la capacidad del virus de bloquear las funciones de estas células a través de diferentes mecanismos. Así, por ejemplo, se ha observado que la interacción de la proteína E2 del VHC y la molécula CD81 de la NK bloquearían la activación de dicha célula, que no produciría IFN gamma, ni desarrollaría su función citolítica y de maduración de las CD^{238,239,272}. In vitro se ha observado que varias proteínas virales (core, NS4A, NS4B, NS5A) pueden inducir la secreción de quimioquinas^{273, 274, 275}, algunas de las cuales podrían facilitar la evasión viral.

Se ha observado que la infección por VHC estimula la producción de CXCL8 en las células estrelladas, hepatocitos, macrófagos y células endoteliales^{276, 277, 278} y que los niveles elevados de CXCL8 inhiben la actividad antiviral del interferón²⁷⁹.

Por otro lado, se ha observado una disminución de NKT en sangre periférica de pacientes infectados por VHC²⁸⁰. Estas células parecen preactivadas en estos pacientes²⁸¹, aunque no se conoce aún con exactitud su papel en la infección por VHC.

- **Alteración del funcionamiento de las células dendríticas.**

La secreción de quimioquinas por las células de Kupffer y los hepatocitos infectados estimula el reclutamiento de CD inmaduras que, a nivel del hígado, se activan, captan el antígeno viral y migran, vía espacio de Disse y tracto portal, a los ganglios linfáticos,

para activar allí la inmunidad específica²⁸². Los receptores de quimioquinas que regulan el reclutamiento de CD inmaduras son CCR2, CCR5 y CXCR3¹³⁶.

Dichas CD secretan IFN tipo I, TNF-alfa, CCL3, CCL4 y CXCL10 e inducen la secreción de CCL2 por otras células, lo cual estimula el reclutamiento de leucocitos²⁸³.

En la infección por VHC existe una alteración en el funcionamiento de las células dendríticas, muy importantes en el desarrollo de la respuesta inmune.

Así, se ha observado una disminución en la producción de IFN alfa por las pCD en pacientes infectados crónicamente por el VHC²⁸⁴, tras la estimulación con ligandos de TLR-9, así como una disminución en la producción de IL-12 por las mCD ante estímulos como CD40L o RMI (I:C)²⁸⁵. Este cambio en el patrón de citoquinas, inducido por el virus, podría explicar un cambio de respuesta Th1 a Th2, ineficaz para eliminar el virus²⁸⁶.

Los mecanismos por los que el virus induciría estas alteraciones no se conocen con exactitud, si bien se ha descrito que proteínas estructurales del VHC podrían interactuar con el TLR-2 de los monocitos/macrófagos, induciendo la producción de IL-10, que finalmente inhibe la producción de IL-12 en las mCD e IFN-alfa en las pCD²⁸⁷. Por otro lado, se ha visto que la infección viral induce la secreción de CCL5 mediante la unión del VHC-E2 a CD81, que atrae CD inmaduras CCR5+ al hígado, secuestrándolas allí, impidiendo la migración de las CD a los ganglios y, por tanto, retrasando el desarrollo de una respuesta inmune eficaz en la fase inicial (crucial) de la infección²⁸⁸.

7.2.- Alteración de la respuesta inmune específica

Los linfocitos T citotóxicos (LTC) virus específicos y las células T CD4 colaboradoras tienen un papel central efector y regulador de la respuesta inmune contra el VHC.

Las células T CD4+ específicas desempeñan un papel fundamental al aportar la ayuda necesaria para la activación de la respuesta citotóxica y humoral.

Las células T CD4 específicas secretan citoquinas tipo Th1 (p.e. IFN gamma), que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, produciendo una respuesta inflamatoria. También pueden producir citoquinas Th2 (p.e. IL-4 e IL- 10), que favorecen el desarrollo de la respuesta humoral ²⁸⁹.

Cuando se desarrolla una respuesta T CD4 multiespecífica, vigorosa y mantenida, de tipo Th1 se tiende a la resolución de la infección ^{290, 291, 292}, mientras que la aparición de una respuesta T CD4 específica débil, reducida a pocas especificidades, facilita la cronificación de la infección ^{293, 294}.

Los LTC CD8+ eliminan el virus por mecanismos citolíticos (apoptosis) y no citolíticos (mediados por citoquinas tipo I como IFN gamma y TNF alfa) ²⁹⁵. En la infección crónica por VHC se observa una respuesta escasa y débil de estas células, que presentan características anérgicas, con poca capacidad de expresar estas citoquinas y de proliferar tras el encuentro antigénico²⁹⁶.

Dicha alteración de la respuesta inmune específica en los pacientes infectados crónicamente por VHC puede venir regulada a distintos niveles:

- Así, se ha observado que la interacción de la proteína del core del VHC con el receptor C1q de las células T disminuye la producción de IL-2 por las mismas²⁹⁷, lo que altera la expresión y maduración celular y la producción de IFN gamma²⁹⁸.
- Por otro lado la intensa estimulación del receptor de la célula T en la infección persistente conduce a la sobreexpresión de la molécula coestimuladora negativa PD-1, que favorece el desarrollo de anergia celular^{299 300 301}.
- También influye que la infección por VHC produce una inadecuada activación por las CPA, en el contexto de expresión de citoquinas tipo Th2/Tc2³⁰².
- Además, en pacientes infectados crónicamente por VHC, se ha demostrado la existencia en el hígado de células T reguladoras CD8 + CCR7 -, que inhiben la acción de las células T CD8 VHC específicas, de manera directa o mediante la producción de IL-10 y TGF- β ^{303, 304, 305}.

8.- PAPEL DE LAS QUIMIOQUINAS Y SUS RECEPTORES EN EL ACLARAMIENTO O CRONIFICACIÓN DEL VIRUS.

Tras la infección por VHC la respuesta inmune del huésped no consigue eliminar el virus en la mayoría de los pacientes, reclutándose una población de células T no específicas que no son capaces de aclarar el virus, pero son responsables de favorecer el daño crónico asociado a esta infección

El desarrollo de esta respuesta inmune viene controlado por las quimioquinas, que son citoquinas quimiotácticas, secretadas por las células infectadas, que interactúan con sus receptores específicos, expresados en las diferentes células del sistema inmune¹⁴⁴.

La importancia de esta interacción se ha demostrado en modelos experimentales de virus influenza, en el que la célula CD8+ citotóxica específica que no expresaba receptores de quimioquinas asociados a respuesta Tc1 no era capaz de alcanzar el sitio de la infección, mientras que las que sí expresaban dichos receptores controlaban la infección sin producir daño hepático (FIGURA 8)³⁰⁶.

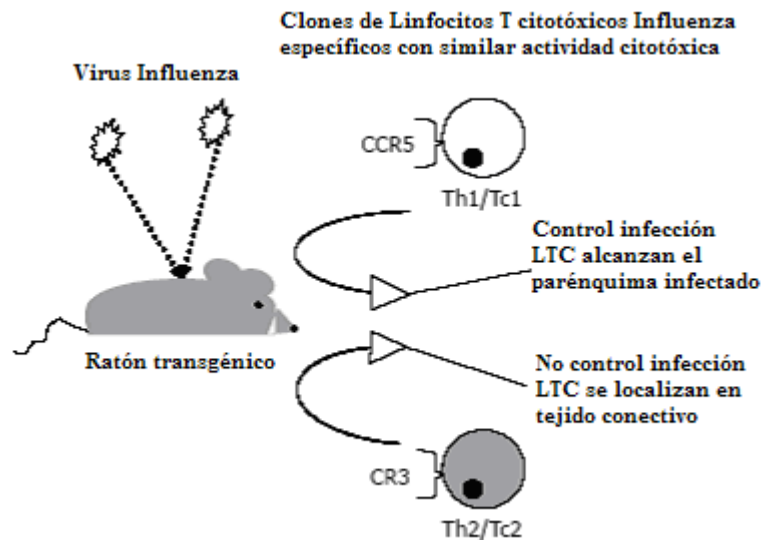


FIGURA 8: Es necesaria una adecuada quimiotaxis para control de la infección

Células T citotóxicas específicas funcionalmente activas in vitro no son capaces de controlar la infección si no expresan los receptores de quimioquinas necesarios para alcanzar el parénquima infectado.

Por otro lado, se ha demostrado que determinadas quimioquinas y sus receptores pueden estar relacionados con el daño hepático persistente (FIGURA 9)³⁰⁷. En un modelo murino de enfermedad injerto contra huésped, el hígado se infiltra por células mononucleares CCR5+ que provocan la muerte del ratón. Sin embargo, el bloqueo de la migración de las células CCR5+ mediante anticuerpos contra este receptor evitaba la migración de las células mononucleares al parénquima hepático y permitía la supervivencia del huésped.

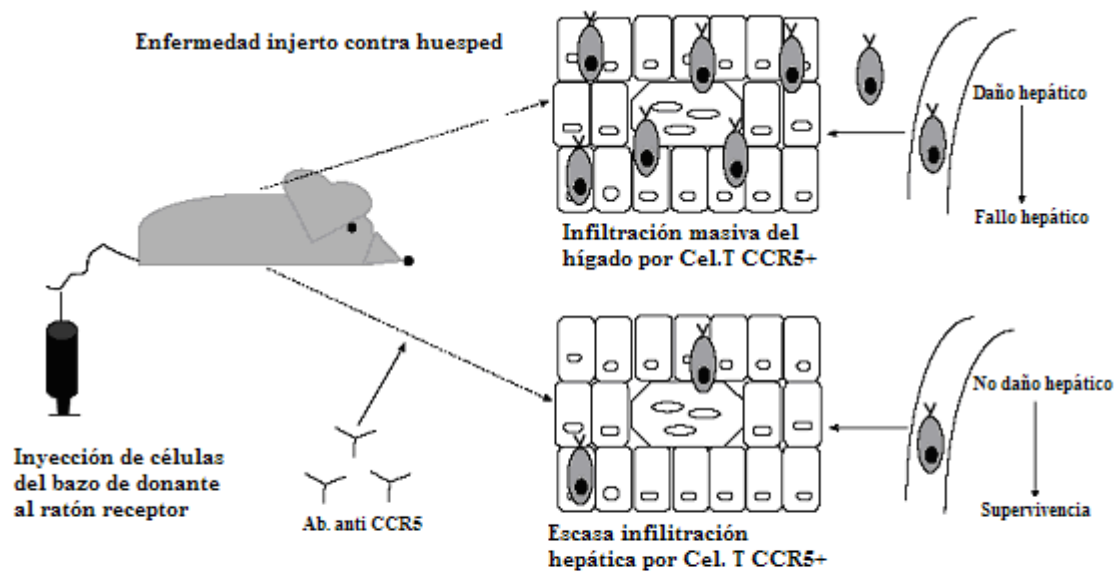


FIGURA 9: La atracción de células T no específicas causa daño hepático.

En un modelo animal de enfermedad de injerto contra huésped el hígado está infiltrado por células T CCR5 +, causantes del daño hepático. Este proceso se puede bloquear usando anticuerpos monoclonales anti-CCR5.

Por tanto, las quimioquinas y sus receptores desarrollan un importante papel en el aclaramiento viral y en el desarrollo de inflamación crónica tisular³⁰⁸.

En la hepatitis crónica VHC se ha estudiado el perfil de expresión de las diferentes quimioquinas, habiéndose demostrado un aumento de los niveles de quimioquinas asociadas a respuesta Th1, como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (ligandos de CXCR3), CCL3, CCL4 y CCL5 (ligandos de CCR5) y CXCL6 (ligando de CXCR6)^{175, 186, 309-312} (FIGURA 10).

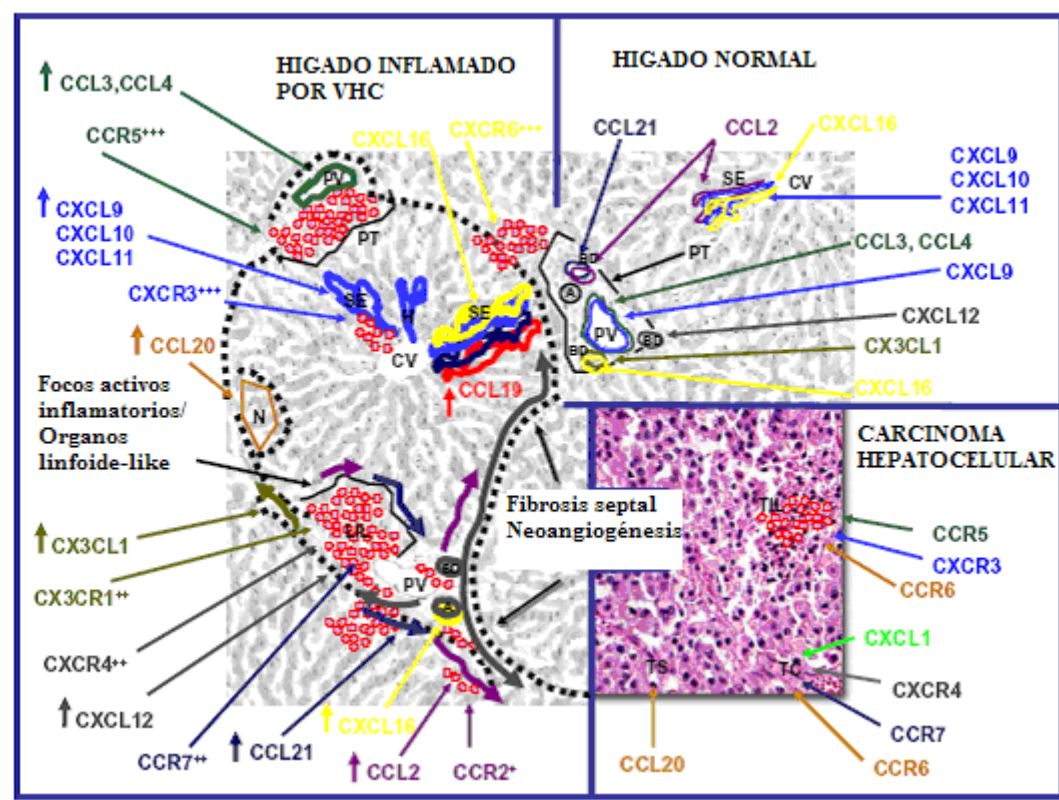


FIGURA 10: Expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas en el hígado normal, hígado inflamado por VHC y en carcinoma hepatocelular.

Localización anatómica de las quimioquinas y sus receptores, basado en análisis inmunohistoquímico de los patrones de expresión de quimioquinas y en tinción con inmunofluorescencia. Cada quimioquina y su receptor son marcados con un color

A, arteria; BD: células del epitelio biliar; CV: vena central; H: hepatocitos; LIL: linfocitos intrahepáticos; N: área necrótica; PT: tractos portales; PV: vena porta; SE: endotelio sinusoidal; TC: células tumorales; TIL: linfocitos infiltrantes tumor; TS: tejido peritumoral;

+, indica que hasta el 30% de los linfocitos intrahepáticos expresaron el receptor;

++, indica que el 30-60% de los linfocitos intrahepáticos expresaron el receptor;

+++, indica que más del 60% de los linfocitos intrahepáticos expresaron el receptor.

La expresión de estas quimioquinas parece ser inducida por determinadas proteínas del VHC, como la proteína del core y NS5A³¹³, aunque existen datos contradictorios³¹⁴.

El aumento de los niveles de estas quimioquinas favorecerían la migración al hígado de células T con fenotipo Th1/Tc1, que expresan sus receptores específicos (CCR5 y

CXCR3), facilitando el aclaramiento viral (FIGURA 11). CCR5 reclutará los linfocitos al tracto portal, mientras que CXCR3 lo hará al parénquima vía sinusoidal^{315, 316, 317, 318}.

Por tanto estos receptores (CCR5 y CXCR3) podrían desempeñar un importante papel tanto en el aclaramiento viral en la fase aguda, mediado por respuesta Tc1 virus específica, como en el daño hepático progresivo durante la fase crónica, secundario al reclutamiento de un infiltrado inflamatorio no específico incapaz de eliminar el virus.

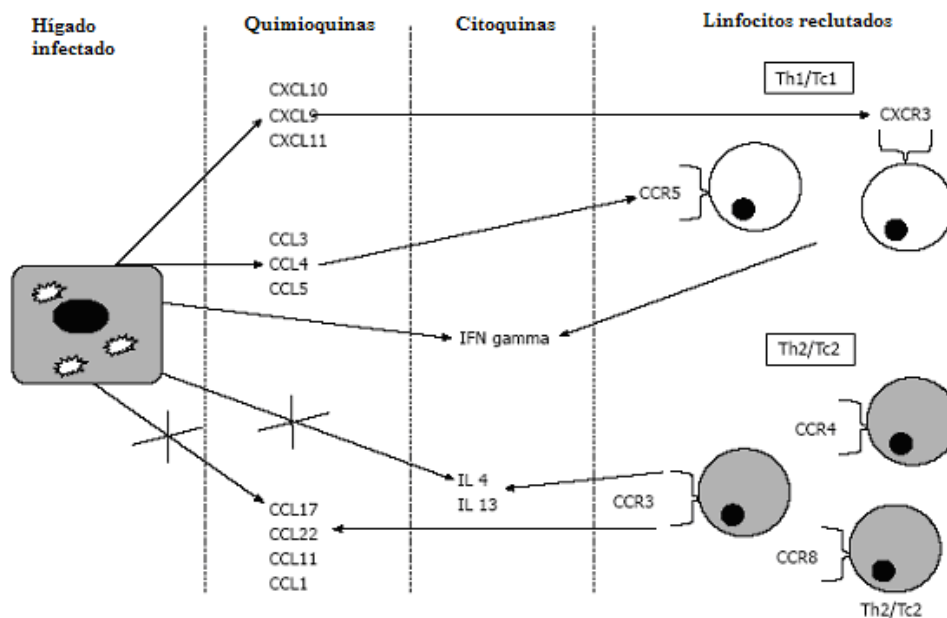


FIGURA 11: Quimioquinas y receptores de quimioquinas relacionados con la patogénesis del VHC. En la hepatitis crónica VHC, las quimioquinas intrahepáticas reclutan células Th1/Tc1 que expresan CCR5 y CXCR3.

Este diferente efecto de las mismas quimioquinas en las fases aguda o crónica de la infección se ha observado en otros modelos animales, como en la infección por el virus de la leucoencefalitis murina, en el que las mismas quimioquinas inducen aclaramiento viral en la fase aguda de la infección, a través de una atracción de células efectoras al sistema nervioso central (SNC), mientras que en la fase crónica de la enfermedad atraen

células inflamatorias a los sitios de persistencia viral, que originan una destrucción de la mielina³¹⁹.

Así, en la mayoría de los pacientes infectados por VHC, la respuesta inmune específica no es capaz de eliminarlo, por la capacidad que tiene el VHC para evadir la respuesta inmune por varios mecanismos, como se ha descrito previamente. Uno de estos mecanismos podría ser una alteración, mediada por el virus, de la expresión de los receptores asociados a respuesta Th1/Tc1, lo cual, por un lado evitaría la eliminación del virus y por otro, disminuiría el daño hepático producido por el infiltrado inflamatorio crónico no específico, ya que, cuando la respuesta inmune no es capaz de controlar la replicación viral, se mantiene la atracción hacia el hígado de un infiltrado inflamatorio no específico, que no es capaz de aclarar el virus, pero origina un daño hepático persistente de baja intensidad³²⁰ (FIGURA 12).

Dicha alteración en la expresión de receptores de quimioquinas podría venir mediada, al igual que sucede en otros virus similares como el GB virus C, por un aumento de sus ligandos específicos, estimulada por el virus. Así se ha demostrado que la proteína E2 del VHC, tras unirse al receptor CD81 induce la secreción de CCR5 por las células CD8+. Además en el hígado infectado se secretan quimioquinas, inducidas por IFN gamma, como CXCL9 y CXCL10, que estimulan la migración de células mononucleares no específicas al hígado, habiéndose demostrado correlación entre la expresión de estas citoquinas y sus receptores con el daño histológico^{Error! Marcador no definido.}.

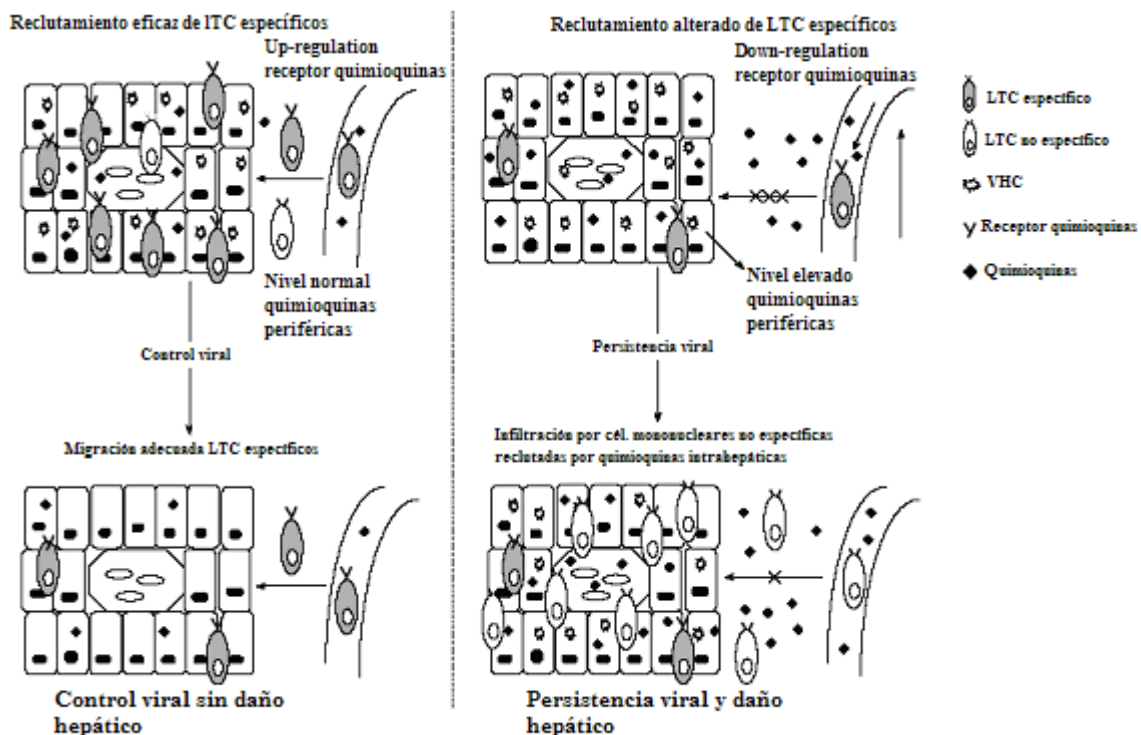


FIGURA 12: Diferencias en la respuesta entre infección por VHC resuelta y persistente.

En la infección resuelta los linfocitos T citotóxicos específicos migran rápidamente al hígado infectado, atraídos por las quimioquinas producidas por los hepatocitos, controlando la infección sin producir daño hepático.

En la infección persistente la migración de las células T está alterada, lo cual impide el aclaramiento viral. Durante la fase crónica, la persistencia del VHC en el hígado, estimula la producción de determinadas citoquinas, que atraen células mononucleares no específicas al hígado, responsables del daño crónico.

El VHC podría bloquear la acción de estas quimioquinas, entorpeciendo la respuesta inmune específica (causante del aclaramiento viral) y no específica (origen del daño hepático progresivo), lo cual, por un lado favorecería la persistencia del virus y, por otro, disminuiría la velocidad de progresión del daño hepático³²¹.

Según este planteamiento, una caída en la carga viral inducida por el tratamiento podría producir un aumento de células T que expresan estos receptores, así como una disminución de sus ligandos específicos, pudiendo ser más significativos estos cambios en los pacientes en que se consiga una respuesta virológica sostenida tras el tratamiento antiviral.

9.- CITOQUINAS Y DAÑO HEPÁTICO

Cuando la respuesta inmune específica no es capaz de controlar la replicación viral se produce la atracción de un infiltrado inflamatorio intrahepático no específico, responsable del daño hepático.

En el hígado infectado se secretan quimioquinas inducidas por IFN-gamma, como CXCL9 y CXCL10, que estimulan la migración de células mononucleares no específicas al hígado. Estas células son incapaces de controlar la infección, pero mantienen un daño hepático persistente de baja intensidad.

Finalmente la inflamación mantenida induce mecanismos regenerativos del parénquima hepático. En este proceso influyen diversos factores, entre los que se encuentran citoquinas como IL-6, TNF-alfa, TGF-alfa, factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y factor de crecimiento epitelial (EGF). Estos factores inducen la activación de factores de transcripción, como NF-kb, STAT3, Ap-1 y C/EBP, que inician la cascada de expresión de genes que conducen a la proliferación hepatocitaria³²².

La inflamación persistente también provoca la activación de células estrelladas, miofibroblastos y fibroblastos, que inician la producción y depósito de colágeno, laminina, fibronectina y proteoglicanos, que favorecen el desarrollo de fibrosis hepática.

La activación de estas células está regulada por citoquinas proinflamatorias, como TGF beta, IL-6, TNF alfa, CCL21 y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) entre otros³²³. Finalmente se produce una disregulación del proceso de regeneración hepática, que conduce al desarrollo de cirrosis hepática.

III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Basándonos en el proceso inductivo comentado en el capítulo anterior, planteamos las siguientes hipótesis:

Hipótesis.

1. El virus de la hepatitis C (VHC) podría alterar el funcionamiento de la respuesta inmune citotóxica durante la infección persistente, mediante una disminución en la expresión en sangre periférica de receptores de quimioquinas asociados a respuesta Tc1 (CCR5 y CXCR3), lo cual disminuiría la capacidad migratoria de las células T CD8+ hacia el hígado, facilitando la supervivencia del huésped.

2. Uno de los mecanismos del tratamiento antiviral para lograr una respuesta virológica sostenida en los pacientes tratados podría ser la reversión de este fenómeno, aumentando la expresión de estas células (CCR5^{elevada} y CXCR3^{elevada}) en sangre periférica, lo cual recuperaría la capacidad migratoria de las células citotóxicas y la llegada de una respuesta específica que permitiría eliminar el virus.

Para contrastar la validez de estas hipótesis trazamos los siguientes objetivos de estudio:

Objetivos específicos

1. Comparar de la frecuencia de células CD8+ CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} en sangre periférica de pacientes con hepatitis crónica por VHC y controles sanos.

2. Valorar la importancia de las células T CD8+ con expresión de receptores de quimioquinas asociados a respuesta Tc1 en el desarrollo de daño hepático en la infección por virus de la hepatitis C. Para ello:

A.- Valoraremos la frecuencia de células CD8+ con expresión de los receptores de quimioquinas CCR5 (CCR5^{elevado}) y CXCR3 (CXCR3^{elevado}) a nivel intrahepático en los pacientes con hepatitis crónica por VHC, comparándolas con su frecuencia en sangre.

B.- Correlacionaremos la frecuencia de dichas células (CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado}) a nivel hepático con el grado de inflamación y fibrosis hepática en los pacientes con hepatitis crónica por VHC.

3. Analizar las modificaciones en la concentración sérica de CXCL10 (ligando de CXCR3) y CCL5 (ligando de CCR5) a lo largo del tratamiento antiviral, correlacionando sus niveles con:

a.- La carga viral del VHC.

b.- El grado de expresión de CXCR3 y CCR5 en las células CD8+ de sangre periférica.

4. Cuantificar la frecuencia de células CD8 CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} en sangre periférica de forma longitudinal a lo largo del tratamiento con Interferón pegilado y Ribavirina, correlacionando las variaciones en la frecuencia de dichas células con el desarrollo de respuesta virológica sostenida tras el tratamiento antiviral.

5. Analizar el valor predictivo de la variación de la frecuencia de células CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} durante el tratamiento para pronosticar el desarrollo de respuesta virológica sostenida.

IV. DISEÑO, MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- AMBITO DEL ESTUDIO.

Los casos se recogieron de forma consecutiva en las consultas externas de atención especializada del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Guadalajara. Los pacientes se reclutaron entre los meses de marzo de 2003 y Diciembre de 2004.

2.- SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO.

Criterios de admisión en el estudio.

Durante el periodo del estudio se eligieron mediante muestreo consecutivo los pacientes remitidos con el diagnóstico de infección crónica por el VHC que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

➤ Criterios de inclusión:

- Edad entre 18 y 65 años.
- Persistencia de RNA frente a VHC positivo durante más de seis meses.
- Transaminasas persistentemente elevadas durante al menos 6 meses antes de ser admitidos en el estudio.
- Genotipo 1

➤ Criterios de exclusión:

- Transaminasas normales
- Genotipo no-1

- Tratamiento antiviral actual o previo. Estos casos fueron excluidos por el efecto que pueda ejercer dicho tratamiento sobre el equilibrio entre la respuesta celular citotóxica y la infección viral.
- Datos clínicos de descompensación hepática, definida por una concentración de bilirrubina sérica elevada (2.5 veces sobre el límite de normalidad), un tiempo de protrombina alargado mas de tres segundos y una concentración de albumina sérica inferior a 3 g/dL o historia clínica de ascitis, varices o encefalopatía.
- Consumo de mas de 20 g. de etanol al día. Los sujetos con consumo elevado de etanol se excluyeron porque el posible daño hepático generado por el etanol podría confundir el grado de inflamación hepática debido al VHC.
- Presencia de otras causas de hepatopatía crónica, realizándose un screening para descartar otras patologías (fármacos, hemocromatosis, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Wilson...).
- Coinfección por otros virus hepatotropos.
- Inmunodepresión primaria o secundaria. Estos pacientes no entraron en el estudio por las posibles consecuencias de la inmunodepresión sobre la respuesta citotóxica. Por tanto también se excluyeron los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

3.- PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.

3.1.- Sujetos seleccionados para el estudio.

Entre marzo de 2003 y diciembre de 2004 se incluyeron a 30 pacientes consecutivos diagnosticados de hepatitis crónica por VHC en el servicio de aparato Digestivo del Hospital Universitario de Guadalajara que cumplieran los criterios de admisión en el estudio. Además de los pacientes problema del estudio se seleccionó como control interno negativo a un grupo de 21 sujetos sanos con RNA-VHC negativo y transaminasas normales, de similares características demográficas a los casos.

De los 30 pacientes diagnosticados de hepatitis VHC, en diecisiete se realizó una biopsia hepática al inicio del estudio. De ellos, catorce enfermos realizaron terapia antiviral combinada con PEG-interferon alfa 2b (1,5ug/Kg) más Ribavirina ajustada al peso (600-1200 mg/día).

De los catorce pacientes tratados, 11 completaron 48 semanas de tratamiento, mientras que en los otros 3 se interrumpió el tratamiento a las 24 semanas debido a persistencia de RNA positivo frente al VHC en ese momento.

Las características clínicas, inmunológicas y virológicas de estos cuatro grupos se describen en la tabla II.

TABLA II	Hepatitis crónica C	Controles sanos
	(n = 30)	(n = 21)
Sexo masculino (%)	69 %	65 %
Edad (años)	41 (7.50)	38 (8.89)
Tiempo de evolución (años)	17.91 (8.46)	-
ALT (IU/L)	89 (61)	22.50 (10)
Carga viral (copias/mL)^a	2.29 x 10 ⁶ (4.74 x 10 ⁶)	-
Genotipo 1 (%)	100 %	-
Respuesta a tratamiento		
(nº/pacientes tratados)		
RFT	11/14	-
Recidiva tras tratamiento	4/14	-
RVS	7/14	-

Los datos se expresan como número de pacientes (n), porcentaje (%) o media más desviación standard (SD) excepto para la carga viral y ALT que se expresan como mediana más rango intercuartil (IQR), ya que estas variables no siguen una distribución normal. ^a El RNA viral se cuantificó mediante “branched DNA assay”.

Se consideró respuesta virológica sostenida (RVS) la persistencia de viremia no detectable y transaminasas normales 6 meses después de finalizar el tratamiento. En base a estos criterios, de los 11 pacientes que completaron 48 semanas de tratamiento, en 7 se alcanzó una RVS, mientras que los otros 4 presentaron recidiva tras la suspensión del tratamiento a pesar de haber presentado respuesta virológica al final del mismo (relapser).

3.2.- Recogida y procesamiento de muestras y datos clínicos

A todos los sujetos admitidos en el estudio se les recogieron durante la visita clínica los datos de interés por medio de un cuestionario normalizado, realizando los controles analíticos habituales en el seguimiento de estos pacientes, incluyendo determinaciones periódicas de viremia frente al VHC. Además, al inicio del estudio y tras 12 y 24 semanas de tratamiento antiviral se extrajeron muestras de sangre heparinizada y no heparinizada, mediante técnica de venopunción estándar, para analizar la expresión de receptores de quimioquinas en linfocitos de sangre periférica y medición de las concentraciones séricas de quimioquinas.

3.2.1.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre heparinizada se utilizaban para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante gradiente de ficol-hypaque (Amersan-Pharmacia Biotech AP, Upsala, Suecia).

Para ello, en un tubo de 15 mL se ponía un tercio de ficol-hypaque y dos tercios de sangre heparinizada. La sangre se dejaba caer con suavidad para evitar que se mezclaran ambos fluidos. El tubo se centrifugaba a 1000 g durante 20 minutos sin freno.

A continuación se extraía con una pipeta la capa de CMSP situada entre el ficol-hypaque y el plasma. Las CMSP eran lavadas dos veces con solución de lavado para eliminar el ficol-hypaque que quedara.

Finalmente las células eran contadas con una cámara de Neubauer en un microscopio óptico tras tinción con azul tripan. Habitualmente se obtenían entre $10\text{-}15 \times 10^6$ CMSP a partir de 10 mL de sangre.

3.2.2.- PROCESAMIENTO DE LA BIOPSIA HEPÁTICA

En los pacientes a los que se realizó biopsia hepática para estudio histológico se procesó un fragmento, no necesario para el diagnóstico, para análisis de receptores de quimioquinas en los linfocitos intrahepáticos (LIH)³²⁴. Para ello, el tejido hepático se lavó en RPMI 1640 con 1% de FCS (Gibco, Les Ullis, Francia) para eliminar la sangre “contaminante”. Posteriormente se añadió colagenasa-I (1 mg/mL; Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO) y DNA-asa (25ug/mL; Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO) para digerir el tejido. A partir de la suspensión celular obtenida se obtuvieron los linfocitos intrahepáticos mediante un gradiente de Ficoll-hypaque.

Los linfocitos intrahepáticos y linfocitos de sangre periférica fueron analizados inmediatamente. Algunos autores han descrito que el aislamiento de linfocitos mediante gradiente de Ficoll-Hypaque produce una disminución en la tinción de los receptores de quimioquinas^{325, 326}. En estudios realizados en nuestro laboratorio, comparando la determinación de receptores de quimioquinas mediante tinción directa y después de separación mediante gradiente de ficol-hypaque, observamos una reducción de un 5-10% para la tinción del CCR5, pero no en la determinación de CXCR3. Sin embargo esto no debería afectar a los análisis comparativos realizados en este estudio, ya que todas las muestras de sangre e hígado estudiadas fueron separadas mediante esta técnica.

3.2.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS CCR5 Y CXCR3

Se incubaron $0,2 \times 10^6$ linfocitos de sangre periférica o un número variable de linfocitos intrahepáticos ($>0,05 \times 10^6$) durante 30 minutos a 4°C con concentraciones saturantes de CD8-Pe (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO), para identificar las células CD8+, y anticuerpos IgG_{2a} CCR5-Cy5 (Pharmigen BD, San Jose CA) o IgG₁ CXCR3-FITC (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN).

Posteriormente se lavaron las células y se analizaron inmediatamente en un Citómetro de Flujo FACS Becton-Dickinson utilizando CellQuestTM software (Becton-Dickinson, San Jose CA).

Se utilizaron controles isotípicos (ratón IgG₁ y ratón IgG_{2a} (Becton-Dickinson, San Jose, CA) para definir el punto de intensidad de fluorescencia a partir del que considerar positiva la tinción para CCR5-Cy5 y CXCR3-FITC.

Una intensidad de fluorescencia para CCR5-Cy5 y CXCR3-FITC superior a 40 U se consideró una alta expresión de estos receptores en base a la tinción del control isotípico. A estas células con elevada intensidad de fluorescencia las denominaremos a partir de ahora CCR5^{elevado} o CXCR3^{elevado}.

3.2.4.- MEDICION DE CXCL10 y CCL3 EN SUERO

Se obtuvieron muestras de sangre no heparinizada de los pacientes al inicio y tras 12 y 24 semanas de tratamiento antiviral, para medir la concentración de CXCL10 y CCL3 en suero mediante técnica de ELISA (Biosource, Camarillo, CA). Las muestras de suero obtenidas se congelaron inmediatamente hasta que se realizó el análisis. El ELISA se realizó según la técnica habitual descrita por el fabricante.

3.2.5.- ANÁLISIS HISTOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO DE LAS BIOPSIAS

Se consideraron válidas aquellas biopsias que contenían al menos 5 espacios porta, y se valoró en ellas el grado de fibrosis e inflamación hepática. Las muestras obtenidas se analizaron por un único patólogo, estratificándolas según el índice de Scheuer³²⁷ (TABLA III).

Actividad porto-periportal:	
0	Ninguna
1	Inflamación portal
2	Piecemeal necrosis leve
3	Piecemeal necrosis moderada
4	Piecemeal necrosis severa
Actividad lobular	
0	Ninguna
1	Inflamación sin necrosis
2	Necrosis focal o cuerpos acidófilos
3	Daño celular focal severo
4	Necrosis en puentes
Fibrosis	
0	Ninguna
1	Fibrosis portal
2	Septos periportales o porto-portales, con arquitectura conservada.
3	Fibrosis con distorsión de la arquitectura
4	Cirrosis

La distribución de las células T en el hígado se visualizó mediante inmunotinción de las biopsias hepáticas procesadas.

El tejido hepático se lavó con buffer citrato (pH 6) para mostrar los antígenos, incubándolo posteriormente con anticuerpos frente a CD8 y CD4 (DAKO, Glostrup, Denmark).

La detección se realizó usando un kit de immunoperoxidasa sensible (EnVision HRP system; DAKO, Glostrup, Denmark) con diaminobenzidina como sustrato, y las muestras fueron teñidas con hematoxilina. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó utilizando azida sódica y peróxido de hidrógeno.

Se calculó el número medio de células CD8 + y CD4 + en los tractos portales y áreas intralobulares en tres campos diferentes de X400.

4.- ANÁLISIS ESTADISTICO

Las variables categóricas se presentan como porcentajes. Las variables cuantitativas normales fueron descritas mediante su media y su desviación estándar. Las que no siguieron una distribución normal se resumieron mediante su mediana y amplitud intercuartil.

Se utilizaron para el análisis de correlación de las variables el coeficiente de Spearman y los test de Wilcoxon, Friedman y U de Mann-Whitney, para comparación de grupos relacionados e independientes.

Se calcularon curvas ROC para estimar la validez de la expresión de los receptores de quimioquinas para predecir respuesta virológica sostenida. Se consideró significativa una $p < 0.05$ bilateral en todas las comparaciones realizadas.

V. RESULTADOS.

1.-EXPRESIÓN DE CCR5^{elevado} / CXCR3^{elevado} EN LA POBLACIÓN DE CÉLULAS CD8+ INTRAHEPÁTICAS.

La mayoría de las células T intrahepáticas, tanto portales como lobulares, fueron CD8+ ($p < 0.001$ y $p < 0,01$, respectivamente) (Tabla IV).

Tabla IV. Hallazgos histológicos de los pacientes con hepatitis crónica C

Histología hepática^a		
Actividad (1-4)	Porto-periportal	1.91 (0.85)
	Lobular	1.66 (0.84)
Fibrosis (1-4)		1.51 (0.95)
Immunohistoquímica:		
(Células CD8+ y CD4+ intrahepáticas por 400 campos) ^b		
Porto-periportal	Cél. CD8+	97.36 (33.82)
	Cél. CD4+	37.92 (18.46)
Lobular	Cél. CD8+	32.36 (14.79)
	Cél. CD4+	7.33 (4.19)

^aÍndice de Scheuer.

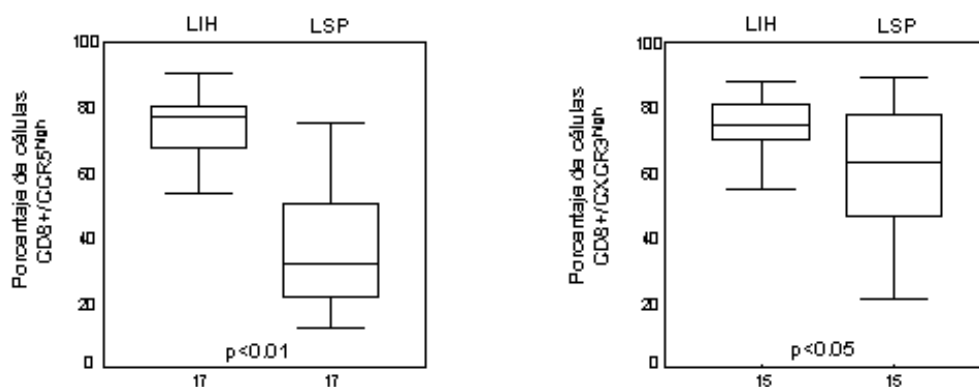
^bLas células CD8+ y CD4+ en las biopsias hepáticas se contaron mediante inmunotinción utilizando inmunoperoxidasa. Los datos se presentan como media más desviación estándar.

Se comparó la frecuencia de células CD8+ intrahepáticas que expresaban CCR5 (CCR5^{elevado}) y CXCR3 (CXCR3^{elevado}) con la expresión de dichas células en sangre periférica, demostrándose un marcado aumento de ambas células en el compartimento intrahepático.

Así, el porcentaje de CD8+/CCR5^{elevado} a nivel intrahepático fue del 76,79% (IQR 18,19), mientras que en linfocitos de sangre periférica dicho porcentaje fue del 31,46% (IQR 31,87) ($p < 0,01$) (Figura 12).

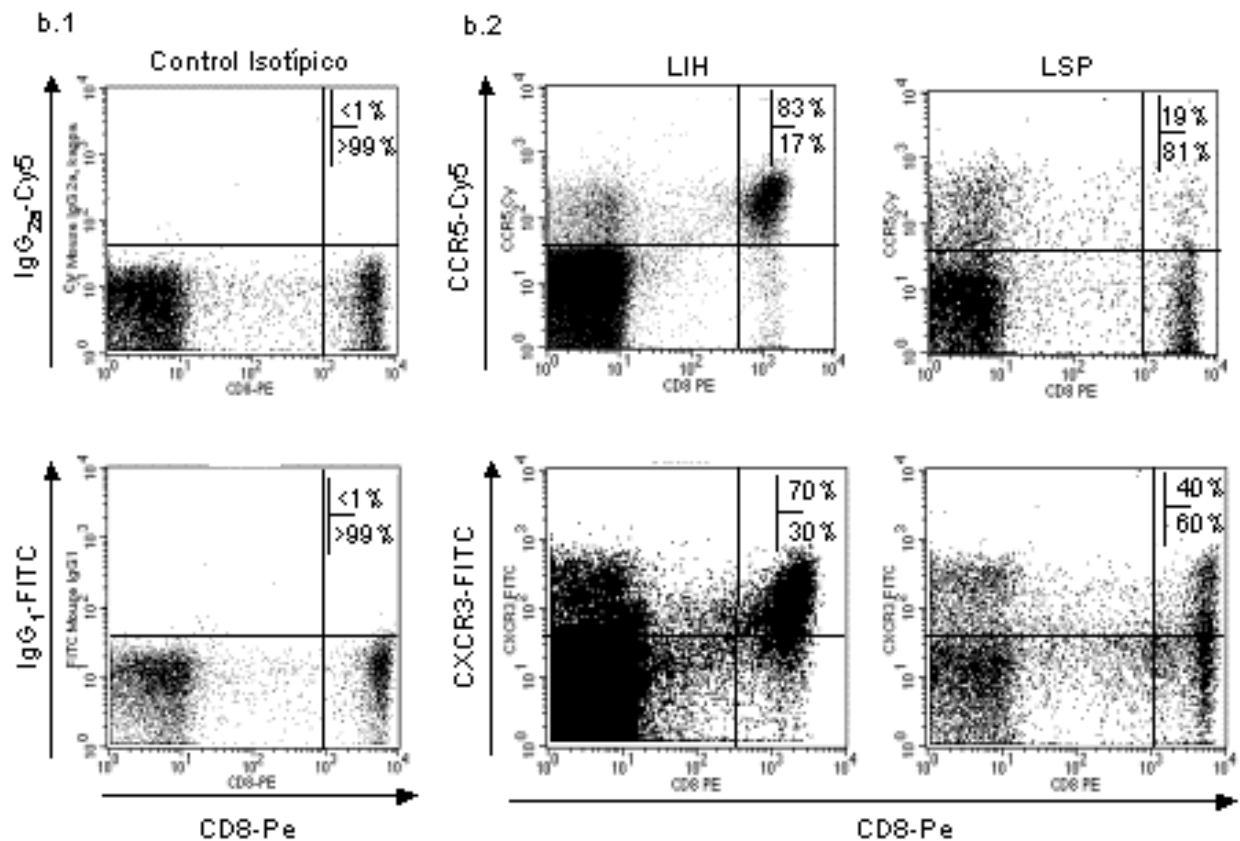
Igualmente, el porcentaje de CD8+ / CXCR3^{elevado} fue también mayor en los linfocitos intrahepáticos (73,3%; IQR 15,05) que en sangre periférica (61,03%; IQR 36,73) ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13. Aumento de células CD8+ CCR5^{elevada} y CXCR3^{elevada} intrahepáticas en hepatitis crónica C genotipo-1.



(A) Diagramas de cajas mostrando el porcentaje de células CD8+ CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} de sangre periférica e hígado de pacientes con muestras pareadas.
LIH: Linfocitos intrahepáticos.
LSP: Linfocitos sangre periférica.

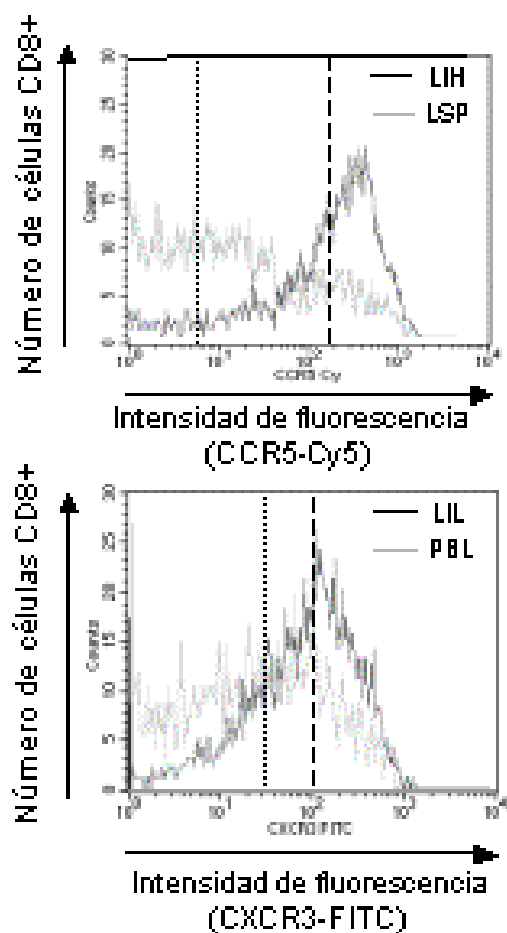
B



(B):

(b.1) **Controles isotípicos.** Los linfocitos de sangre periférica se tiñeron con anticuerpos CD8-Pe y dos controles isotípicos diferentes, IgG2a-Cy5 o IgG1-FITC.

(b.2) **Linfocitos de sangre periférica e intrahepáticos de un paciente con hepatitis crónica C.** Los linfocitos de sangre periférica e intrahepáticos se tiñeron con anticuerpos CD8-Pe y con anticuerpos CCR5-Cy5 o CXCR3-FITC. En el cuadrante superior derecho se representan las células doble positivas (CD8+/receptor de quimioquinas^{elevado}).



(b.3) Intensidad de fluorescencia para CCR5-Cy5 y CXCR3-FITC en células CD8+ intrahepáticas (línea gris) y sangre periférica (línea negra) del mismo paciente.

-----: Valor medio de intensidad de fluorescencia de CCR5-Cy5 (Mediana: 173 unidades) y CXCR3-FITC (Mediana: 103 unidades) en células CD8+ intrahepáticas.

.....: Valor medio de intensidad de fluorescencia de CCR5-Cy5 (Mediana: 6 unidades) y CXCR3-FITC (Mediana: 33 unidades) en células CD8+ de sangre periférica.

^aWilcoxon test.

LSP: linfocitos de sangre periférica.

LIH: linfocitos intrahepáticos

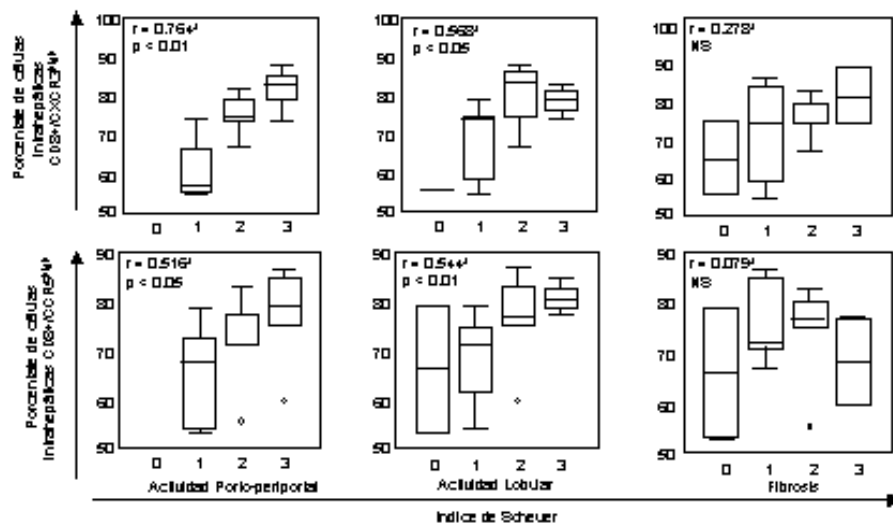
Algunos autores han observado que la utilización de colagenasa para aislar los linfocitos intrahepáticos produjo una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia de la tinción para CXCR3³²⁸, aunque en otras publicaciones se describe la capacidad de estudiar la expresión de CXCR3 en células T tisulares mediante FACS, a pesar de utilizar colagenasa para aislar estas células^{186, 329,330}. En cualquier caso, estos hechos no afectan la demostración de la existencia de una mayor expresión de células CD8 + / CXCR3^{elevado} a nivel de los linfocitos intrahepáticos, en comparación con las células de sangre periférica, que quizás hubiera sido incluso más patente si hubiéramos utilizado otro método para aislar los linfocitos intrahepáticos.

2.- CORRELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE CÉLULAS CD8 + CCR5^{elevado} /CXCR3^{elevado} INTRAHEPATICAS Y LA INFLAMACIÓN HEPATICA

Se analizó la correlación entre la presencia de células CD8 + con expresión de CCR5 y CXCR3 a nivel intrahepático y el grado de inflamación y fibrosis hepática, observando una correlación entre la expresión de estas células a nivel intrahepático y la actividad porto-periportal y lobular (Figura 14), aunque no obtuvimos correlación con el grado de fibrosis.

Figura 14. Correlación entre inflamación hepática y frecuencia de células CD8+ CCR5 y CXCR3 intrahepáticas en hepatitis crónica genotipo-1.

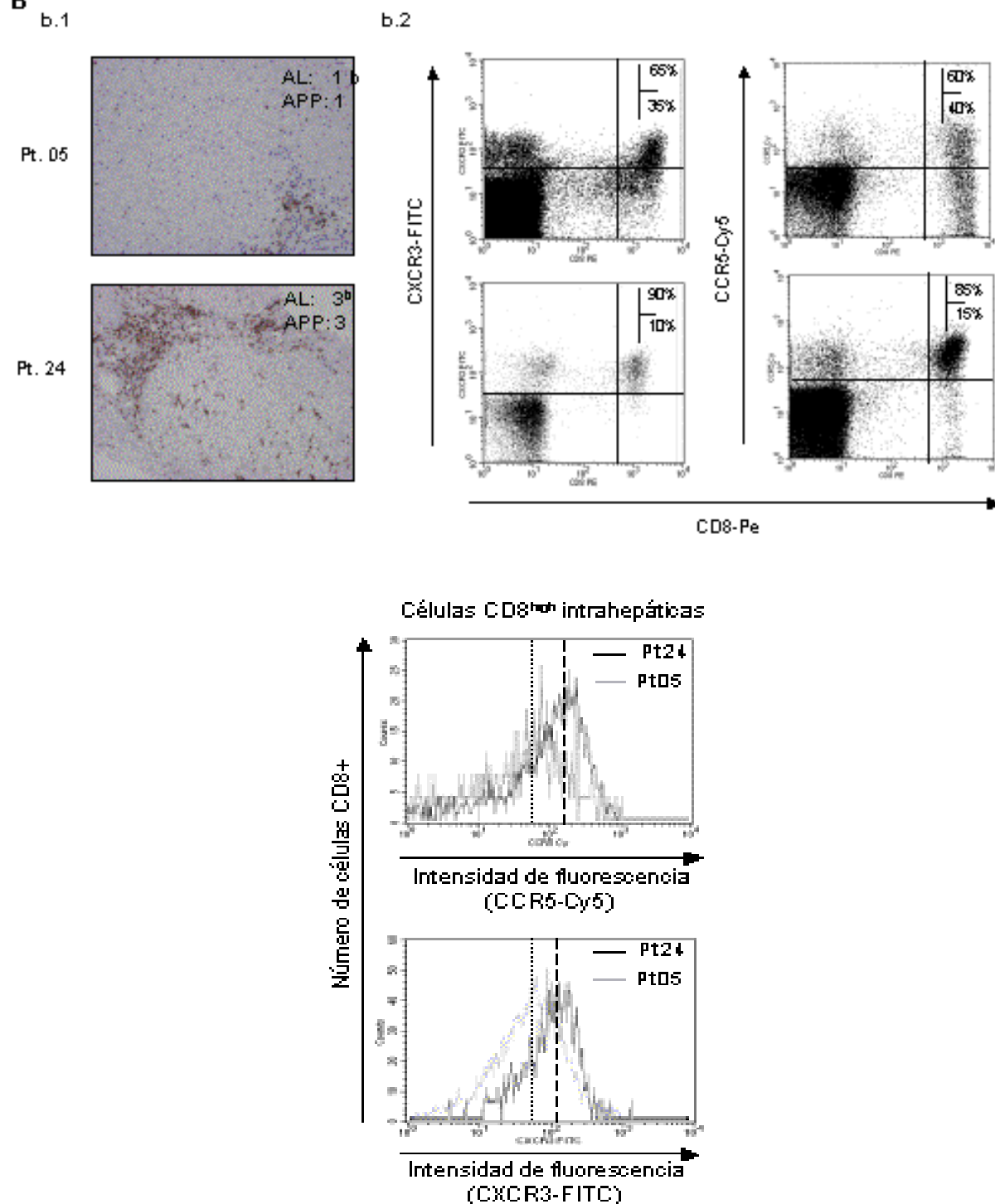
A:



(A): Porcentaje de células CD8+ intrahepáticas expresando CCR5^{elevado} o CXCR3^{elevado} en relación con el grado de inflamación y fibrosis hepáticas.

^aCoefficiente de correlación de Spearman. NS: no significativo

B



(b.1) **Microfotografías representativas de la inmunotinción hepática para CD8 de dos pacientes con hepatitis crónica C (05 y 24) con diferentes grados de inflamación.** Las células CD8 se tiñeron en marrón oscuro mediante inmunoperoxidasa. Magnificación original x400. El paciente 05 con actividad lobular (AL) 1 y porto-periportal (APP) 1 mostró tinción leve, mientras que el paciente 24 con AL 3 y APP 3 presentó intensa tinción para CD8. b Índice de Schauer.

(b.2) **Linfocitos intrahepáticos de estos dos pacientes después de tinción con anticuerpos CD8-Pe y con CCR5-Cy5 o CXCR3-FITC.** En el cuadrante superior derecho se representan las células doble positivas (CD8+/Receptor de quimioquinas^{elevado}).

3.- EXPRESIÓN DE CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado} EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DESPUÉS DE 24 SEMANAS DE TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Comparamos el número de células CD8 + de sangre periférica que expresaban CCR5 y CXCR3 de controles sanos y pacientes con hepatitis crónica por VHC antes de tratamiento antiviral, observando una menor frecuencia de dichas células en pacientes con hepatitis VHC, aunque sin alcanzar significación estadística (Tabla V).

Tabla V. Porcentaje basal de células CD8+ CCR5^{elevado}/CXCR3^{elevado} en sangre periférica en pacientes con hepatitis crónica C y controles sanos.

	Controles sanos	Hepatitis crónica C	p ^a
Cél. CD8+/CCR5^{elevado} (%)	28.30 (IQR 21.74)	24.51 (IQR 28.46)	NS
Cél. CD8+/CXCR3^{elevado} (%)	66,06 (IQR 10.88)	60,98 (IQR 27.39)	NS

Los datos se expresan como mediana más rango intercuartil (IQR).

^aMann-Whitney U test.. NS: no significativo.

Por otro lado, cuantificamos la expresión de dichas células en los pacientes tratados con interferon pegilado y Ribavirina, antes de iniciar dicho tratamiento y en las semanas 12 y 24 del mismo.

Observamos un aumento de la expresión de células CD8 + / CXCR3^{elevado} a las 24 semanas de terapia en 11 de los 14 pacientes analizados, respecto a las cifras basales, con un incremento medio de un 11,5% en estas células (IQR 25,92) ($p < 0,01$; Fig 15).

Asimismo observamos un aumento de la expresión de células CD8 + / CCR5^{elevado} tras el tratamiento en 11 de 13 pacientes analizados, con un incremento medio de un 10,25% en estas células respecto a las cifras basales (IQR 13,50; $p < 0,05$) (Figura 15).

4.- MODIFICACIONES EN LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE CXCL10 Y CCL3 DURANTE EL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Analizamos la concentración sérica de CXCL10 y CCL3 al inicio y en las semanas 12 y 24 del tratamiento, para determinar si existía una asociación con la modificación de la expresión de sus receptores en las células T CD8 + de sangre periférica.

Las concentraciones séricas basales de CXCL10 y CCL3 fueron mayores en los pacientes con hepatitis crónica por VHC que en los controles sanos ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente) (Tabla VI).

Tabla VI. Porcentaje basal de células CD8+ CCR5^{elevado}/CXCR3^{elevado} en sangre periférica y concentración sérica de CCL3/CXCL10 en pacientes con hepatitis crónica C y controles sanos.

	Controles sanos	Hepatitis crónica C	p^a
CCL3 (pg/mL)	4.81 (IQR 9.87)	8.24 (IQR 8.02)	$p < 0.01$
CXCL10 (pg/mL)	140.50 (IQR 103.10)	378.77 (IQR 153.38)	$p < 0.05$

Los datos se expresan como mediana más rango intercuartil (IQR). ^aMann-Whitney U test.

Durante las primeras 24 semanas de tratamiento se evaluó la modificación de CCL3 y CXCL10 en suero. La concentración sérica de CXCL10 bajó progresivamente desde 378,77 pg/mL al inicio (IQR 153,38) hasta 298,52 pg/mL en la semana 24 de tratamiento (IQR 154,45) ($p < 0,05$; Figura 15).

Observamos similares resultados al analizar la concentración sérica de CCL3, que descendió desde 8,24 pg/mL (IQR 8,02) al inicio hasta 6,70 pg/mL (IQR 4,51) en la semana 24 de tratamiento ($p < 0,05$; Figura 15).

Ambos descensos se correlacionaron con el incremento en la expresión de CCR5 y CXCR3 en las células CD8 tras el tratamiento (Figura 15).

Cuando analizamos los resultados en la semana 12 de tratamiento antiviral, observamos un diferente comportamiento en la modificación de los niveles séricos de CXCL10 en función de la presencia o no de una posterior respuesta virológica sostenida. Así en los pacientes respondedores al tratamiento los niveles de CXCL10 descendieron 63,01 pg/mL (IQR 233,45) mientras que en los no respondedores, dicho descenso fue solamente de 3,55 pg/mL (IQR 94,80), aunque dicha variación no alcanzó significación estadística.

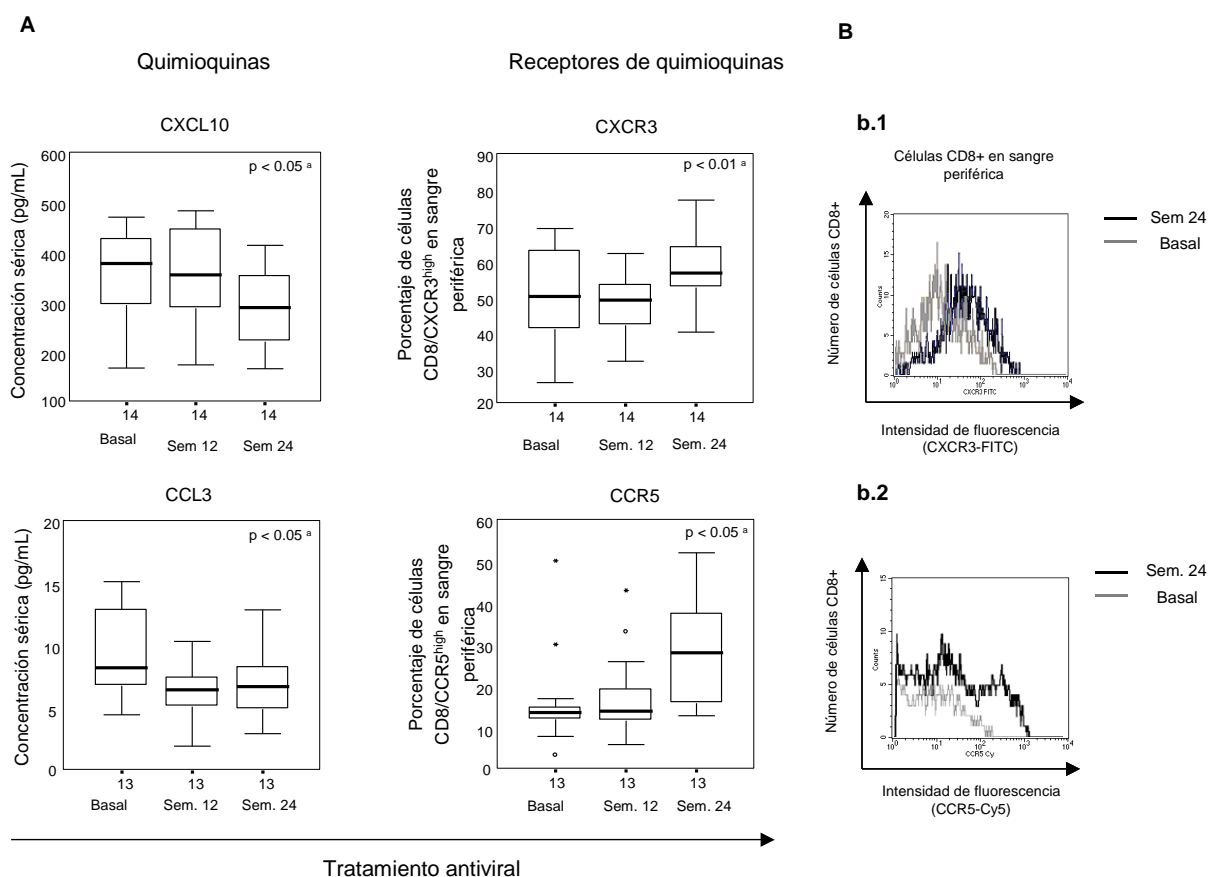


Figura 15. Concentración sérica de quimioquinas y expresión de receptores de quimioquinas en las células CD8+ de sangre periférica durante el tratamiento anti-viral en pacientes con hepatitis crónica C genotipo-1.

(A): Box-plots representando la concentración sérica de CXCL10 y CCL3 y el porcentaje de células CD8+ expresando CXCR3^{elevado} o CCR5^{elevado} durante las primeras 24 semanas de tratamiento. Se observó un descenso en la concentración sérica de CXCL10 y CCL3 durante el tratamiento, asociado a un incremento de las células CD8+ que expresaban CCR5 y CXCR3.

^aTest de Friedman. o: outlier value. *: valor extremo.

(B): Histogramas de intensidad de fluorescencia para CXCR3-FITC (b.1) y CCR5-Cy5 (b.2) en las células CD8+ de un paciente con hepatitis crónica C, antes (línea gris) y después de 24 semanas de tratamiento (línea negra).

Cuando correlacionamos las concentraciones séricas de estas quimioquinas con la carga viral del VHC en los diferentes momentos del estudio encontramos una correlación significativa entre la viremia y la concentración de CCL3 ($r = 0,47$; $p < 0,01$) y una correlación positiva, aunque sin alcanzar significación, con la concentración de CXCL10 ($r = 0,32$; $p = 0,076$) (Figura 16).

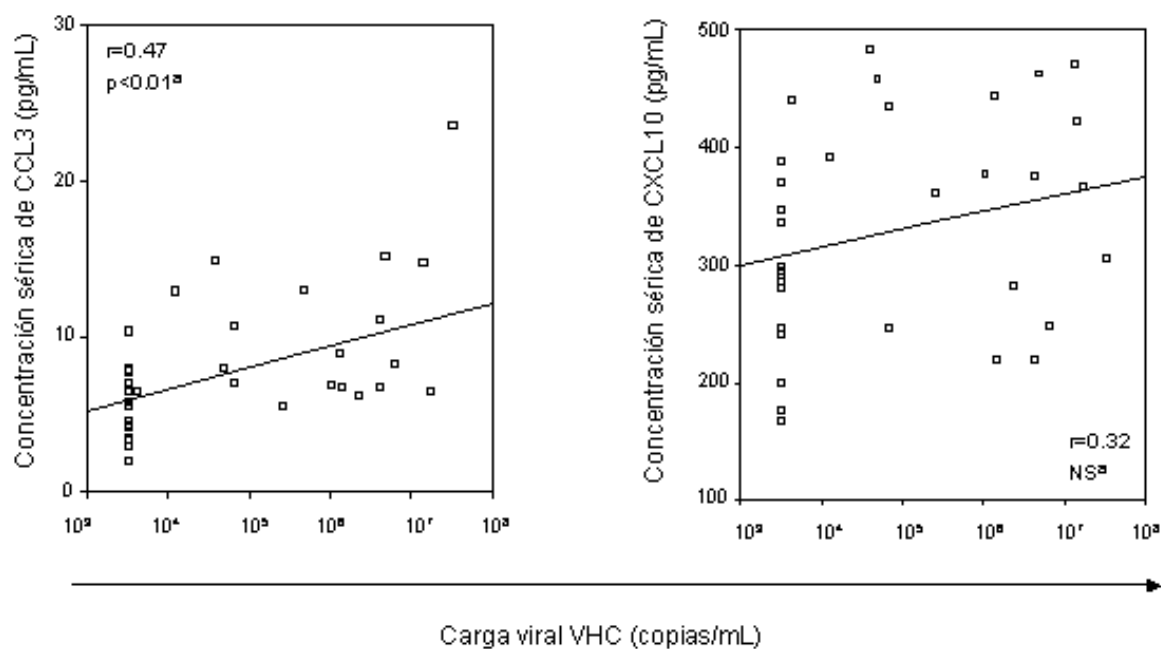


Figura 16. Correlación entre la carga viral del VHC y la concentración sérica de CCL3/CXCL10.

Se analizaron la relación entre la carga viral y los niveles séricos de CCL3/CXCL10 basales, y en la semana 12 y 24 de tratamiento, observando una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre los niveles séricos de CCL3 y la carga viral, existiendo asimismo una correlación positiva, aunque sin alcanzar significación, con los niveles de CXCL10.

^aCoefficiente de correlación de Spearman. NS: no significativo.

5.- CORRELACIÓN ENTRE EL GRADO DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN LAS CÉLULAS T CD8 + Y RESPUESTA VIROLÓGICA SOSTENIDA A TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Analizamos la posibilidad de predecir la existencia de una respuesta virológica sostenida en función del grado de expresión de los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR3.

Observamos que un incremento en la expresión de células CD8+ CXCR3^{elevado} de un 14% predijo el desarrollo de respuesta virológica sostenida con un valor predictivo positivo del 100%, mientras que un incremento de dicho receptor menor de un 1% tras 24 semanas de tratamiento se asociaba con ausencia de respuesta virológica, presentando un valor predictivo negativo del 100%. En la figura 17 se muestra la variación de la frecuencia de células CD8+ CXCR3+ tras 24 semanas de tratamiento en los pacientes con y sin respuesta virológica sostenida. También se muestra una tabla con los distintos valores de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y negativo según los diferentes puntos de corte de la variación de las células CD8+ CXCR3+. Finalmente se muestra la curva ROC de la variable variación de la frecuencia de células CD8+ CXCR3+ tras 24 semanas de tratamiento para predecir respuesta virológica sostenida.

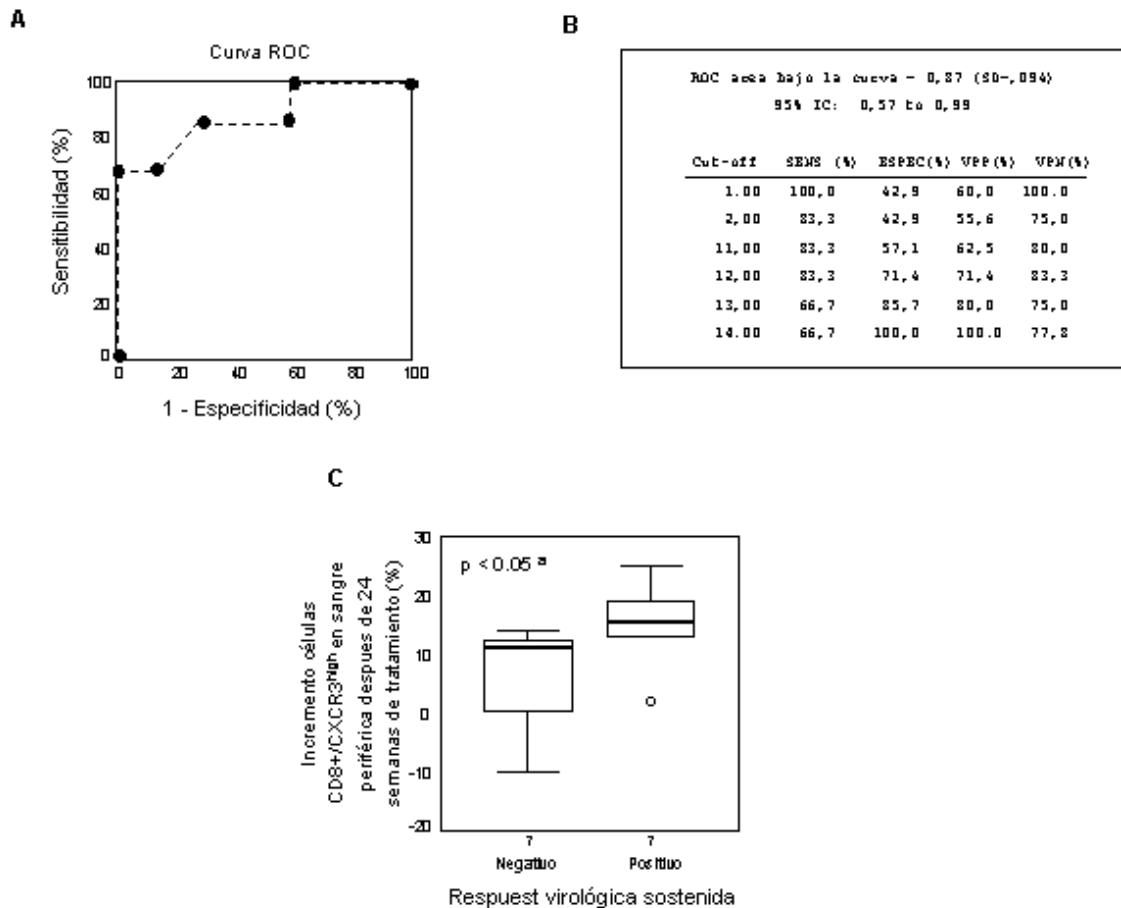


Figura 17. Correlación entre el incremento después del tratamiento de células CD8+ de sangre periférica que expresaban CXCR3 y la respuesta virológica sostenida en pacientes con hepatitis crónica por VHC genotipo 1.

(A): Curva ROC del incremento en las células CD8+ CXCR3^{elevado} de sangre periférica después de 24 semanas de tratamiento antiviral.

(B) Tabla mostrando la sensibilidad (SENS), especificidad (ESPEC), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de diferentes puntos de corte del incremento de células CD8+ CXCR3^{high}. IC: intervalo de confianza

(C) Incremento de células CD8+ CXCR3^{high} después de 24 semanas de tratamiento antiviral en pacientes con respuesta virológica positiva y negativa al mismo.

^aMann-Whitney U test. o: outlier value.

Por otro lado, no se encontró relación significativa entre el incremento de la frecuencia de células CD8+ CCR5+ y el desarrollo de respuesta virológica sostenida.

VI.- DISCUSIÓN

El hígado contiene una gran población de linfocitos residentes que influyen, tanto en la respuesta inmune adaptativa (células T CD4+ y CD8+), como en la innata (células natural killer y natural killer T)³³¹ (FIGURA 18)

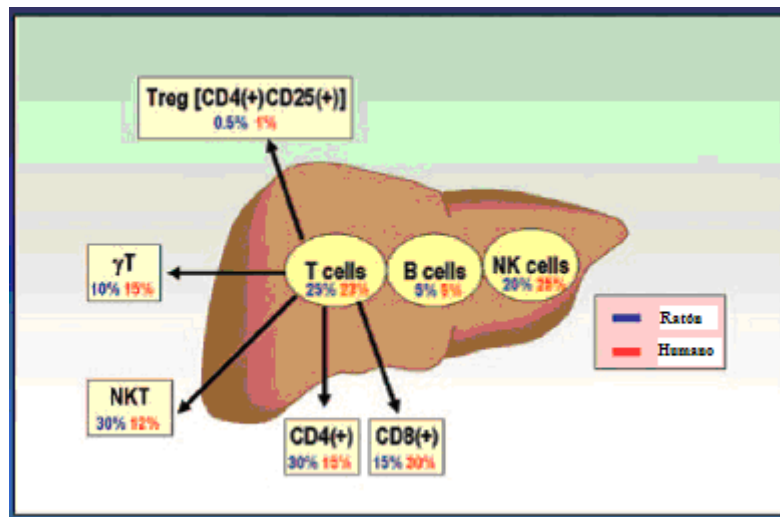


FIGURA 18. Distribución linfocitaria en el hígado de ratones y humanos

Este órgano desempeña un papel fundamental en la primera línea defensiva frente a los antígenos extraños procedentes del intestino, manteniendo un balance entre tolerancia y generación de una respuesta inmune a los mismos.

La alteración de este equilibrio, a través de múltiples mecanismos, conduce al desarrollo de daño hepático mediado por el reclutamiento y activación de células T en el hígado (CD4, CD8, natural killer).

Durante la infección por VHC la inflamación crónica, así como los fenómenos de regeneración y fibrosis, son claves en el daño hepático. Las citoquinas desempeñan un papel fundamental en la regulación de este proceso.

En la infección aguda y crónica por el virus de la hepatitis C existe reclutamiento de múltiples subtipos de células inmunes hacia el parénquima hepático. Este proceso inflamatorio es esencial en la supresión de la replicación viral, pero también contribuye al desarrollo del daño hepático necroinflamatorio y en la progresión hacia fibrosis^{332, 333,}

³³⁴.

Nuestro trabajo confirma que en la infección crónica por VHC existe un secuestro intrahepático de células T CD8+ que expresan receptores de quimioquinas asociados a respuesta tipo Tc1^{335, 336, 337}. Este fenómeno se debe probablemente a la atracción por las quimioquinas producidas por el hígado infectado, aunque no pueden descartarse otras causas de esta elevada concentración intrahepática de células T CD8+ que expresan CCR5 y CXCR3, como podrían ser la muerte a ese nivel de las células con diferentes receptores de quimioquinas o la sobrerregulación de estos receptores en la población de células CD8+ intrahepática.

Los ligandos de CCR5 y CXCR3 desempeñan un papel fundamental en la migración transendotelial para facilitar la entrada al hígado de las células T, pudiendo secretarse

por las células endoteliales³³⁸, células estrelladas³³⁹, otras células próximas al endotelio, o por células procedentes de sangre periférica que a nivel del sinusoides, favorecidas por el lento flujo a ese nivel, son capturadas por proteoglicanos a través del endotelio^{340, 341} (FIGURA 19).

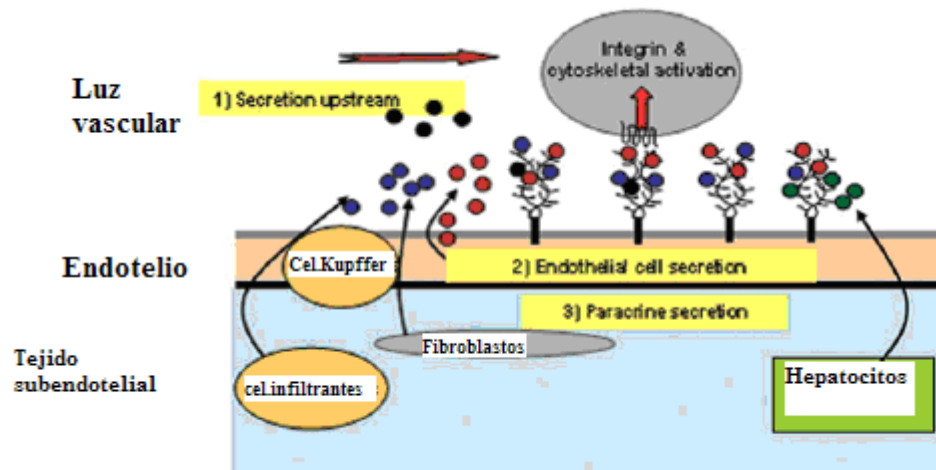


FIGURA 19.- El endotelio puede presentar quimioquinas secretadas por las células endoteliales o por células del tejido infectado, incluidos hepatocitos, células estrelladas, células de Kupffer y leucocitos, o capturar quimioquinas secretadas por otras células como los colangiocitos.

Así, se ha observado en pacientes infectados crónicamente por el VHC un aumento en la expresión de los ligandos de CCR5 y CXCR3 a nivel del endotelio sinusoidal³⁴², lo que favorecería la atracción de células efectoras que expresen los receptores de quimioquinas específicos.

Además, las quimioquinas desempeñan un papel importante en la adhesión de los linfocitos al endotelio vascular, mediante la activación de integrinas en la superficie leucocitaria^{343, 344}, facilitando la diapédesis de los leucocitos adheridos a través del endotelio³⁴⁵ y favoreciendo la migración a través del endotelio al sitio de la inflamación,

basada en un gradiente de quimioquinas³⁴⁶, y su activación para desempeñar funciones efectoras^{347, 348, 349} (FIGURA 20).

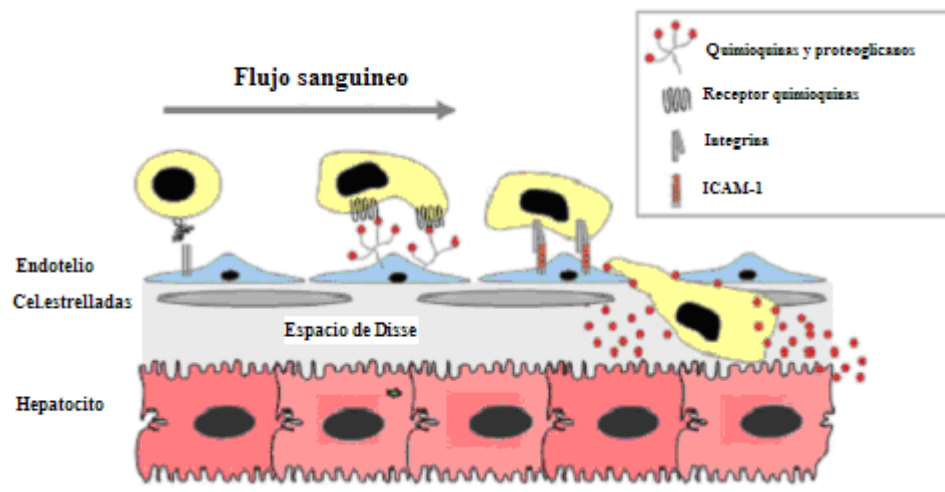


FIGURA 20.- Migración transendotelial

Inicialmente las células se ponen en contacto con la célula endotelial. Posteriormente las quimioquinas activan receptores específicos en los leucocitos, que estimulan la unión con determinados ligandos de la célula endotelial (ICAM-1, VCAM-1), permitiendo la migración a través del endotelio, también controlada por quimioquinas.

Estas quimioquinas pueden permanecer en los sitios de inflamación gracias a su capacidad para unirse a los proteoglicanos, lo que permite ser retenidas en el glicocalix endotelial y matriz extracelular^{350, 351}.

Tras la estimulación de los hepatocitos por la infección viral estos aumentan la secreción de quimioquinas y la expresión de moléculas de adhesión, incrementando el reclutamiento de linfocitos a través del endotelio sinusoidal^{352, 353}.

El receptor de quimioquinas CXCR3 está muy expresado en las células efectoras activadas, encontrándose estrechamente ligado a la respuesta inmune tipo Th1/Tc1³⁵⁴.

Sus ligandos (CXCL9, CXCL10 y CXCL11) son producidos por hepatocitos, células estrelladas hepáticas y células endoteliales del sinusoides hepático³⁴², tras la estimulación por citoquinas proinflamatorias, fundamentalmente interferón gamma y TNF alfa, liberadas por la células Kupffer y posteriormente por células dendríticas, natural killer y natural killer T, en respuesta a la infección. Las células T CD4+ también liberan estos ligandos tras ser activadas por los antígenos virales expresados en el hepatocito³⁵⁵.

CXCL9, CXCL10 y CXCL11 están aumentados en muchas enfermedades hepáticas distintas de la hepatitis crónica por VHC, lo que sugiere que desempeñan un papel general de reclutamiento de células efectoras al hígado inflamado³⁵⁶.

Se ha observado que los linfocitos intrahepáticos de pacientes infectados crónicamente por VHC expresan altos niveles de CXCR3 y muestran una capacidad aumentada de migración en respuesta a sus ligandos específicos, sobreexpresados en suero e hígado en estos pacientes^{311, 342, 357-359}.

Por otro lado, se ha observado que las células T efectoras CXCR3^{elevado} producen múltiples citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores citotóxicos, como IFN-gamma, TNF-alfa, CCL5 y perforina^{360, 361}, que podrían contribuir a la inflamación y daño hepático durante la infección crónica por el virus. Esto explicaría la correlación positiva que se ha encontrado entre los niveles intrahepáticos de CXCL10 y CXCL11 y la severidad de la enfermedad hepática³⁶².

En pacientes con infección crónica por VHC, la inflamación y fibrosis hepática se localiza fundamentalmente en las áreas portales, lo cual podría explicarse en parte por el

reclutamiento hacia dichas áreas de células efectoras que expresan CCR5, estimulado por la existencia de unos niveles elevados de sus ligandos específicos (CCL3, CCL4 y CCL5) en pacientes infectados por VHC^{363, 364, 365} (FIGURA 21).

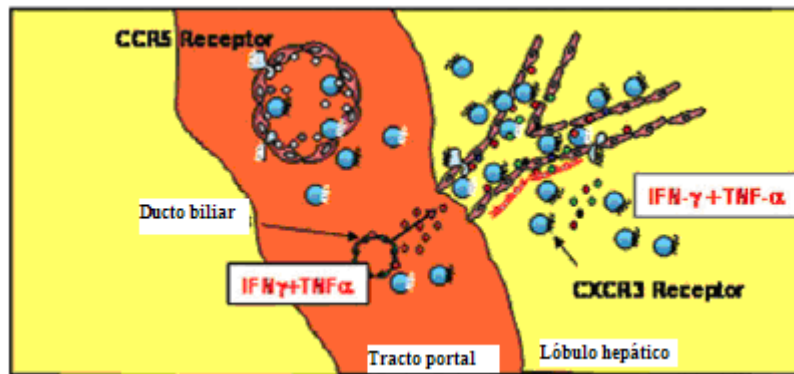


FIGURA 21.- Los ligandos de CXCR3 (CXCL9-10-11) son fundamentales en el reclutamiento de linfocitos vía endotelio sinusoidal, mientras que los ligandos de CCR5 son mas importantes en la migración a través del endotelio vascular portal.

De la importancia de este receptor (CCR5) en la modulación de la respuesta inflamatoria hepática habla el hecho, por ejemplo, de que el tratamiento con antagonistas de CCR5, estudiado como posible terapia para el VIH (CCR5 es un coreceptor necesario para la infectividad por este virus), haya tenido que suspenderse por el desarrollo de hepatotoxicidad severa^{366, 367, 368}, y que pacientes con la mutación CCR5 delta 32, que tienen una deficiencia en la expresión de este receptor, por un lado parecen tener un mayor riesgo de cronificación del VHC espontáneamente o tras tratamiento antiviral³⁶⁹⁻³⁷⁴ y, por otro, presentan un menor grado de inflamación hepática³⁷⁵.

CCR5 se expresa fundamentalmente en las células Th1/Tc1^{376, 377, 378}, favoreciendo una migración de estas células al tejido tras la interacción con sus ligandos específicos

sobreexpresados en el hígado de pacientes infectados por VHC, así como en el endotelio³⁷⁴, siendo claves en el reclutamiento de células efectoras a los tractos portales³⁷⁹.

Parece que la expresión elevada de estos ligandos podría venir inducida por determinadas proteínas del virus, como es la proteína E2³⁸⁰ que, mediante a su unión a la tetraespanina CD81 favorece la expresión de quimioquinas como CCL5³⁸¹.

En base a todo lo previamente comentado, se he especulado con la posibilidad de bloquear el receptor CCR5 para disminuir el daño hepático, evitando la migración de las células T hacía el hígado, en pacientes en que no se haya conseguido eliminar el virus³⁸²⁻³⁸⁵, aunque aún no está aclarada la eficacia de esta medida y los posibles efectos adversos derivados de la inmunosupresión generada en estos pacientes³⁸⁶⁻³⁸⁹.

En consonancia con estos datos, al igual que otros autores^{377, 390, 391, 392}, hemos observado en nuestro estudio un aumento marcado de la expresión de células T CD8+ intrahepáticas que expresaban CCR5 y CXCR3 en los pacientes con infección crónica por VHC, con unas diferencias estadísticamente significativas respecto a la concentración de estas células en sangre periférica, lo que sugiere la existencia de una migración y secuestro, mediado por quimioquinas, de estas células en el hígado en los pacientes con infección crónica por VHC.

Por otro lado, hemos observado una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de células CD8+ CXCR3^{elevado} y CCR5^{elevado} a nivel intrahepático con el grado de inflamación hepática de estos pacientes. Estos datos muestran que el

reclutamiento de estas células al hígado esta implicado en la patogenia del daño hepático inmunomediado en la infección persistente por VHC.

Se observó en este estudio una correlación positiva con el grado de fibrosis, aunque sin alcanzar significación estadística, probablemente por el escaso número de pacientes, ya que dicha correlación, descrita por otros autores, parece evidente, ya que las quimioquinas están relacionadas con la fibrosis, tanto directamente, mediante el reclutamiento de células inflamatorias que activan la fibrogénesis, como por activación directa de las células estrelladas hepáticas^{393, 394}, que se transforman en miofibroblastos, que a su vez expresan quimioquinas y receptores de quimioquinas que favorecen el proceso fibrogénico^{395, 396}. Así, por ejemplo, se ha observado en modelos animales que CCL3, secretado por macrófagos y células epiteliales, es profibrótico. Además en ratones con deficiencia de CCR5 se ha observado que desarrollan menos fibrosis, probablemente mediada por una menor expresión de IL-4 e IL-13, citoquinas profibróticas que inducen la expresión de CCL3 y CCL2³⁹⁷. Por tanto, se ha demostrado que la inflamación intrahepática es uno de los factores predictivos más importantes de progresión de la fibrosis en los pacientes con hepatitis crónica por VHC³⁹⁸⁻⁴⁰¹. Como se ha demostrado en este estudio la expresión de receptores de quimioquinas asociado a respuesta Tc1 es esencial en el desarrollo del proceso inflamatorio intrahepático.

Cuando se han estudiados hígados sanos, de pacientes no infectados y sin otra causa de hepatopatía, se ha observado en los mismos la presencia de una infiltración por linfocitos CCR5^{elevado} y CXCR3^{elevado}, probablemente debido a un papel de estas células en el mantenimiento de una respuesta inmune fisiológica frente a los antígenos extraños procedentes del intestino⁴⁰², aunque otros autores piensan que la presencia de estas

células a nivel intrahepático sería debida a que el hígado constituiría un órgano fundamental en el aclaramiento de las células T vía apoptosis^{403, 404}.

La mayoría de las células T en los hígados sanos se localizan en el tracto portal, y esto podría ser debido a una menor expresión de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en el endotelio sinusoidal no inflamado⁴⁰⁵.

La migración al hígado de las células específicas que expresan CXCR3 y CCR5 viene determinada por la concentración de sus ligandos específicos. Así se ha observado que la expresión de CXCL10 (ligando de CXCR3) a nivel de hígado y sangre periférica está aumentada en los pacientes con hepatitis crónica por VHC^{406, 175, 407}, existiendo una correlación de sus niveles, tanto en sangre periférica como en hígado, con el grado de inflamación lobular hepática en estos pacientes^{408, 409}.

Aunque no existen datos en humanos, en estudios realizados en chimpancés en la fase aguda de la infección, se ha observado que los niveles intrahepáticos de CXCL10 comienzan a elevarse en la primera semana de la infección, manteniéndose altos hasta la eliminación del virus^{410, 411}, mientras que en los casos en que la infección se cronifica, una secreción continuada de estas quimioquinas mantendría la inflamación en el hígado. Parece que estas quimioquinas se producen fundamentalmente por los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales⁴¹², en base al estímulo mediado por citoquinas proinflamatorias (sobre todo TNF alfa e IFN gamma)^{413, 414, 415} o estimulación directa por determinadas proteínas virales, como NS5A y proteína del core³¹², existiendo una correlación entre los niveles basales de CXCL10 y la respuesta al tratamiento antiviral^{416, 417, 418}.

Por otro lado, los ligandos de CCR5, como CCL3, también podrían desempeñar un papel en el aclaramiento viral y en el daño hepático secundario a la inflamación crónica, dado que este receptor de quimioquinas se expresa en linfocitos T⁴¹⁹, células NK⁴²⁰, monocitos⁴²¹ y células endoteliales⁴²², habiéndose observado niveles elevados de sus ligandos en suero^{Error! Marcador no definido.} e hígado⁴²³ en pacientes infectados por VHC, pudiendo estimularse su secreción a nivel de los hepatocitos en los pacientes infectados, como sucede en otros virus hepatotropos como el VHB⁴²⁴.

En nuestro estudio hemos observado una concentración sérica basal de CXCL10 y CCL3 superior en los pacientes con hepatitis crónica VHC que en controles sanos, existiendo una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles de CCL3 y la carga viral, así como una correlación positiva, aunque sin alcanzar significación estadística, entre carga viral y niveles séricos de CXCL10.

Estos datos sugieren que existe una estimulación directa de la secreción de estas quimioquinas durante la infección viral para favorecer el reclutamiento intrahepático de una respuesta Th1/Tc1 específica que consiga el aclaramiento del virus. No obstante, también se reclutan células no específicas que en el caso de no controlarse la infección favorecerán el daño crónico.

Se ha observado previamente que en pacientes con hepatitis crónica por VHC existe una disminución de las células CD8+ de sangre periférica que expresaban CCR5 y CXCR3⁴²⁵. En nuestro estudio observamos una disminución de la expresión de estos

receptores en sangre periférica de sujetos infectados crónicamente, aunque sin alcanzar significación estadística.

Esa disminución de los receptores de quimioquinas produce un descenso en la migración de los linfocitos T en respuesta a sus quimioquinas específicas en estos pacientes, lo que disminuye la migración hacia el hígado de una respuesta Th1/Tc1, responsable del aclaramiento viral, mientras que la expresión de CCR4, asociado a respuesta tipo Th2, no parece afectarse en estos pacientes, permitiendo la existencia de una inflamación crónica persistente.

La causa de esta alteración de la expresión de receptores asociados a respuesta Th1/Tc1 no está clara, pudiendo ser debida a:

- Existencia de un secuestro intrahepático de estas células³⁷⁷, que explicaría la alta concentración de las mismas a nivel hepático, observada por varios autores y confirmada en nuestros resultados. Esta quimiotaxis celular vendría estimulada por la secreción por los hepatocitos de CXCL9, CXCL10 (ligandos de CXCR3) y CCL5, CCL3 (ligandos de CCR5), inducida por proteínas del virus como NS5A y core^{¡Error! Marcador no definido.}, aunque algunos estudios realizados con biopsias hepáticas seriadas demostraron una disminución progresiva de la presencia de estas células a nivel hepático en estos pacientes a lo largo de la evolución de la infección⁴²⁶.
- Inactivación de CCR5 mediada por interleukina 10, que está aumentada en los pacientes con hepatitis VHC⁴²⁷.

- Internalización de los receptores de quimioquinas al citoplasma, al igual que se ha observado en otros virus similares, como el GB virus C^{428, 429}, mediada por proteínas del virus^{430, 431}, o por la exposición a sus ligandos específicos^{!Error!} **Marcador no definido.**,^{432, 433, 434}. Esto explicaría los hallazgos encontrados en nuestro estudio, en el que se observa una correlación inversa entre los niveles de quimioquinas séricas y el grado de expresión de sus receptores específicos en las células T, si bien este mecanismo no parece explicar por sí solo el descenso de los receptores, ya que, en pacientes VHB no se observa este descenso de los receptores de quimioquinas, a pesar de existir también niveles elevados de las mismas quimioquinas en sangre periférica.

En cuanto a las vías por las que el tratamiento antiviral podría interferir con alguno de los mecanismos del virus para eludir la respuesta inmune específica del huésped a través de la alteración de la quimiotaxis, en nuestro estudio observamos:

- Un aumento de la expresión de células CD8 CXCR3^{elevado} y CCR5^{elevado} en sangre periférica tras 12 y 24 semanas de tratamiento antiviral con interferon pegilado y ribavirina.
- Concentraciones basales en sangre periférica de CXCL10 (ligando de CXCR3) y CCL3 (ligando de CCR5) significativamente mayores en pacientes infectados respecto a controles sanos, que descendían de modo significativo a lo largo del tratamiento antiviral, existiendo una

correlación entre el aumento en sangre periférica de los células CD8 con expresión de CXCR3/CCR5 y el descenso de sus ligandos específicos.

Cuando analizamos la modificación de los niveles de CXCL10 en la semana 12 de tratamiento antiviral en función de si existía o no respuesta virológica sostenida (RVS) tras el mismo, observamos un descenso de dichos niveles mayor en los pacientes con RVS, existiendo además una correlación entre la carga viral del VHC y los niveles séricos de CCL3 y CXCL10.

Asimismo observamos un aumento significativo de la frecuencia de células T CD8 + que expresaban CXCR3 en sangre periférica en los pacientes con RVS tras el tratamiento. La variación de la frecuencia de estas células tras 24 semanas de tratamiento tenía un valor predictivo positivo (VPP) del 100% para predecir RVS cuando ese aumento era del 14%, a costa de una sensibilidad del 66,7%, mientras que un incremento inferior al 1% se asociaba con ausencia de respuesta virológica, con un valor predictivo negativo del 100% y una especificidad del 42,9%.

Estos datos nos hacen pensar que uno de los mecanismos por el que el VHC podría evadir la respuesta inmune sería alterando la expresión de receptores de quimioquinas asociados a respuesta Tc1 en las células T CD8+. Este efecto lo podría lograr mediante el incremento de la expresión de los ligandos de estos receptores que inducirían la internalización del receptor. El tratamiento antiviral con interferón pegilado y ribavirina podría actuar revirtiendo este proceso, mediante una disminución de los ligandos específicos y un aumento secundario de la expresión de los receptores de quimioquinas CXCR3 y CCR5 en células T CD8+ de sangre periférica.

Además, la cuantificación del grado de aumento de la expresión de dichos receptores y la disminución de sus ligandos en sangre periférica tras 12-24 semanas de tratamiento nos podría permitir predecir que pacientes van a responder al final del mismo, pudiendo constituir un dato pronóstico más a tener en cuenta a la hora de tomar la decisión de suspender el tratamiento junto a los que se consideran en la actualidad.

Por otro lado, en base a este planteamiento, podría ser de utilidad la utilización terapéutica de anticuerpos frente a estos receptores de quimioquinas y/o sus ligandos en pacientes con VHC, al igual que se ha estudiado en otros cuadros. Así se ha demostrado que el uso de anticuerpos monoclonales frente a CCR5 es eficaz en evitar la infección de las células T por el virus de la inmunodeficiencia humana^{435, 436, 437}, así como en disminuir la inflamación tisular en algunos modelos animales⁴³⁸. Por otro lado, el bloqueo de CXCL10 se ha mostrado eficaz para tratar un modelo experimental de colitis^{439, 440} y la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CXCR3 tiene un efecto anti-inflamatorio en modelos animales de artritis⁴⁴¹ y podrían ser de utilidad en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal⁴⁴². Estas moléculas no han sido estudiadas extensamente en la infección por VHC, debido a la ausencia de un modelo animal que permita probar su eficacia y seguridad, aunque la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CCR5 en un modelo animal de fallo hepático ha producido una disminución en la inflamación intrahepática, permitiendo la supervivencia del ratón⁴⁴³.

Por tanto, al menos desde un punto de vista teórico, el bloqueo de la interacción entre CCR5/CXCR3 y sus ligandos específicos podría disminuir la inflamación crónica progresiva que se produce en aquellos pacientes en los que no se logra la eliminación del virus con el tratamiento.

VII.- CONCLUSIONES.

1.- En los pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis C existe un aumento en el compartimento intrahepático de la frecuencia de células CD8+ con expresión de receptores de quimioquinas asociados a respuesta inmune tipo Th1/Tc1 ($CCR5^{\text{elevado}}$ y $CXCR3^{\text{elevado}}$), existiendo una correlación entre la frecuencia de dichas células y el grado de inflamación hepática en estos pacientes.

2.- En la fase crónica de la infección existe una disminución de la frecuencia de células CD8+ con fenotipo $CCR5^{\text{elevado}}$ y $CXCR3^{\text{elevado}}$ en sangre periférica. Dicha frecuencia guarda una correlación inversa con la concentración sérica de sus ligandos (CXCL10 y CCL5), lo que podría explicarse por la existencia de una internalización de dichos receptores tras la unión a CXCL10 y CCL5 que son inducidas por el VHC.

3.- El tratamiento antiviral con interferón pegilado y ribavirina revierte este fenómeno, aumentando la frecuencia de células CD8+ con fenotipo $CCR5^{\text{elevado}}$ y $CXCR3^{\text{elevado}}$ en sangre periférica. Este hecho se relaciona con una disminución de la concentración sérica de CXCL10 y CCL5, producida por el tratamiento antiviral.

4.- El grado de variación en la frecuencia de células T CD8+ con elevada expresión del receptor de quimioquinas CXCR3 en sangre periférica tras 24 semanas de tratamiento antiviral constituye un factor pronóstico de desarrollo de respuesta virológica sostenida.

VIII. APÉNDICES.

VIII.1 Abreviaturas utilizadas.

Anti-VHC: anticuerpos contra el virus de la hepatitis C.

CD: Células dendríticas.

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica.

CPA: Células presentadoras de antígeno.

CK: Citoquinas.

CSF: Factor estimulante de colonias.

EGF: Factor de crecimiento epitelial.

GF: Factor de crecimiento.

HGF: Factor de crecimiento hepatocitario.

HLA: Sistema mayor de histocompatibilidad.

IFN: Interferón.

IL: Interleuquinas.

LIH: Linfocitos intrahepáticos.

LSP: Linfocitos de sangre periférica.

LPS: Lipopolisacarido.

LTC: Linfocito T citotóxico.

NK: Células natural Killer.

NKT: Células natural Killer T.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PEG-IFN: Interferón Pegilado.

PRR: Pattern recognition receptors.

QQ: Quimioquinas.

RBV: Ribavirina.

RCT: Receptor de células T.

RIG-I: RNA-helicase receptors.

RNA: Acido ribonucleico.

RQ: Receptor de quimioquinas.

RVS: Respuesta virológica sostenida.

TGF: Transforming grow factor.

TLR: Toll like receptors.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor preditivo negativo.

VIII.2.- Indice de gráficos.

Página

<i>Figura 1: Prevalencia estimada de la infección por VHC</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2: Implicación de los diferentes tipo de células inmunes en el reconocimiento y eliminación del VHC</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3: Receptor de célula T (TCR)</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4: Interacción entre el linfocito T citotóxico y el hepatocito infectado.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5: Red de quimioquinas implicadas en la respuesta inmune.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 6: Desplazamiento de las células inmunes a través del ganglio linfático</i>	<i>28</i>
<i>Figura 7: Mecanismos de interferencia del VHC con el sistema inmune del huésped.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8: Importancia de la quimiotaxis para el control de la infección.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 9: Infiltrado no específico y daño hepático</i>	<i>45</i>
<i>Figura 10: Expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas en el hígado normal, hígado inflamado por VHC y carcinoma hepatocelular.....</i>	<i>48</i>

<i>Figura 11: Quimioquinas y receptores de quimioquinas relacionados con la patogénesis del VHC.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 12: Diferencias en la respuesta entre infección por VHC resuelta y persistente.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 13: Aumento de células CD8+ CCR5 elevadas y CXCR3 elevadas en hepatitis crónica C genotipo 1.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 14: Correlación entre inflamación hepática y frecuencia de células CD8+ CCR5 y CXCR3 intrahepáticas en hepatitis crónica C genotipo 1.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 15: Concentración sérica de quimioquinas y expresión de receptores de quimioquinas en las células CD8+ de sangre periférica durante el tratamiento antiviral en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 16: Correlación entre carga viral del virus Cy nivel sérico de CCL3/CXCL10.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 17: Correlación entre el incremento de células CD8+ CXCR3 ^{elevada} tras el tratamiento antiviral y el desarrollo de respuesta virológica sostenida.....</i>	<i>78</i>

Figura 18: Distribución linfocitaria en el hígado de ratones y humanos 79

Figura 19: Expresión de quimioquinas a nivel endotelial 81

Figura 20: Migración transendotelial..... 82

Figura 21: Importancia de las quimioquinas en el reclutamiento endotelial 84

VIII.3.- Indice de tablas.

Página

Tabla I: Tipos de quimioquinas y sus receptores en las distintas células del sistema inmune	23
Tabla II: Características de los pacientes	58
Tabla III: Indice de Scheuer.....	62
Tabla IV: Hallazgos histológicos de los pacientes	65
Tabla V: Porcentaje basal de células CD8+ CCR5 ^{elevado} y CXCR3 ^{elevado} en sangre periférica en pacientes con hepatitis crónica y controles sanos	71
Tabla VI: Porcentaje basal de células CD8+ CCR5 ^{elevado} y CXCR3 ^{elevado} en sangre periférica de CCL3/CXCL10 en pacientes con hepatitis crónica C y controles sanos.....	73

VIII. FINANCIACIÓN.

Esta tesis doctoral fue parcialmente financiada con la ayuda de:

- Fiscam, J.C.C.M” (Ayuda para proyectos de investigación en salud; PI-03017-00

X. BIBLIOGRAFIA

¹ Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(9):558-67.

² Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:74-81.

³ Domínguez A, Bruguera M, Plans P, Costa J, Salleras L. Prevalence of hepatitis A antibodies in schoolchildren in Catalonia (Spain) after the introduction of universal hepatitis A immunization. *J Med Virol.* 2004;73(2):172-6.

⁴ Sacristán B, Gastañares MI, Elena A, Sacristán M, Barcenilla J, García JC, Yangüela J. Seroepidemiologic study of hepatitis C virus infection in a general population from the region of La Rioja, Spain. *Med Clin (Barc).* 1996;107(9):331-5.

⁵ Riestra S, Fernández E, Leiva P, García S, Ocio G, Rodrigo L. Prevalence of hepatitis C virus infection in the general population of northern Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(5):477-81.

⁶ Solà R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jardí R, Sunyer J, Covas MI, Marrugat J. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study. *Med Clin (Barc)*. 2002;119(3):90-5.

⁷ Prieto Domingo JJ, Carrion Bolanos JA, Brabdes Moya F. Prevalence of hepatitis C virus and excessive consumption in a non hospital worker population. *Gastroenterol Hepatol* 1997;20:479-483.

⁸ OPTN U.S. Liver transplants performed January 1,1988-April 30,2008. www.optn.org

⁹ Snowberger N, Chinnakotla S, Lepe RM, Peattie J, Goldstein R, Klintmalm GB, Davis GL. Alpha fetoprotein, ultrasound, computerized tomography and magnetic resonance imaging for detection of hepatocellular carcinoma in patients with advanced cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26(9):1187-94.

¹⁰ Di Bisceglie AM, Lyra AC, Schwartz M, Reddy RK, Martin P, Gores G, Lok AS, Hussain KB, Gish R, Van Thiel DH, Younossi Z, Tong M, Hassanein T, Balart L, Fleckenstein J, Flamm S, Blei A, Befeler AS; Liver Cancer Network. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the United States: influence of ethnic status. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(9):2060-3.

¹¹ Ryder SD. Outcome of hepatitis C infection: bleak or benign?. *J Hepatol*. 2007;47(1):4-6.

¹² Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004;39(1):5-19.

¹³ Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health*. 1996;86(5):655-61.

¹⁴ Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*. 1989;321(22):1494-500.

¹⁵ Pomper GJ, Wu Y, Snyder EL. Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. *Curr Opin Hematol*. 2003;10(6):412-8.

¹⁶ Laperche S. Blood safety and nucleic acid testing in Europe. *Euro Surveill*. 2005;10(2):3-4.

¹⁷ Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, Ujiie N, Endo C, Matsui A. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *The Vertical*

Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Eng J Med* 1999;330(1):744-750.

¹⁸ Forns X, Martínez-Bauer E, Feliu A, García-Retortillo M, Martín M, Gay E, Navasa M, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M, Rodés J. Nosocomial transmission of HCV in the liver unit of a tertiary care center. *Hepatology* 2005;41(1):115-22.

¹⁹ Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M, Fàbregas S, Vega R, Salmerón J, Diago M, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M; Spanish Acute HCV Study Group. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol*. 2008;48(1):20-7.

²⁰ Wreghitt TG. Blood-borne virus infections in dialysis units--a review. *Rev Med Virol*. 1999;9(2):101-9.

²¹ Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S99-105.

²² Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S35-46.

²³ Seeff LB. The natural history of hepatitis C-A quandary. *Hepatology*. 1998;28(6):1710-2.

²⁴ Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*. 1999;341(8):556-62.

²⁵ Vogt M, Lang T, Frösner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, Wiebecke B, Langer B, Meisner H, Hess J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med*. 1999;341(12):866-70.

²⁶ Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med*. 1999;340(16):1228-33.

²⁷ Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology*. 2000;32(1):91-6.

²⁸ Nguyen MH, Whittemore AS, Garcia RT, Tawfeek SA, Ning J, Lam S, Wright TL, Keeffe EB. Role of ethnicity in risk for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(9):820-4.

²⁹ Massard J, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, Poynard T. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2006;44(1 Suppl):S19-24.

³⁰ Bissell DM. Sex and hepatic fibrosis. *Hepatology*. 1999;29(3):988-9

³¹ Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol*. 2001;34(5):730-9.

³² Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006;3(2):47-52.

³³ Shev S, Dhillon AP, Lindh M, Serléus Z, Wejstål R, Widell A, Norkrans G. The importance of cofactors in the histologic progression of minimal and mild chronic hepatitis C. *Liver* 1997;17(5):215-23.

³⁴ Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112(2):463-72.

³⁵ Takahashi M, Yamada G, Miyamoto R, Doi T, Endo H, Tsuji T. Natural course of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1993;88(2):240-3.

³⁶ Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hürter D, Nawrocki M, Kruska L, Hensel F, Petry W, Häussinger D. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998 Dec;28(6):1687-95.

³⁷ Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Omata M. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology* 1995;21(3):650-5.

³⁸ Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J, Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 5):1075-84.

-
- ³⁹ Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446(7137):801-5.
- ⁴⁰ Sanz-Cameno P, Borque MJ, García-Buey L, Moreno-Otero R. Interacción del virus de la hepatitis C con la membrana celular. *Gastroenterol Hepatol* 2002;25:521-5.
- ⁴¹ Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999;30(3):595-601.
- ⁴² Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:215-229.
- ⁴³ Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005;436:946-952.
- ⁴⁴ Freeman AJ, Pan Y, Harvey CE, Post JJ, Law MG, White PA, Rawlinson WD, Lloyd AR, Marinos G, French RA. The presence of an intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response is associated with low viral load in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003;38(3):349-56.
- ⁴⁵ García-Monzón C, Sánchez-Madrid F, García-Buey L, García-Arroyo A, García-Sánchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic

hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995;108(1):231-41.

⁴⁶ Dustin LB, Rice CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 2007;25:71-99.

⁴⁷ Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.

⁴⁸ Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303(5663):1526-9.

⁴⁹ Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e, Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303(5663):1529-31.

⁵⁰ Seya T, Funami K, Taniguchi M, Matsumoto M. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J Endotoxin Res*. 2005;11(6):369-74.

⁵¹ Stetson DB, Medzhitov R. Immunity Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. 2006;24(1):93-103.

⁵² Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. Science. 2006;314(5801):997-1001.

⁵³ Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol. 2006;6(11):836-48.

⁵⁴ Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, Rice CM. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. Gastroenterology 2006;131(6):1887-98.

⁵⁵ Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Vlotides G, Eichhorst ST, Göke B, Diepolder H, Auernhammer CJ. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. Biochem Biophys Res Commun 2005;331(2):543-8.

⁵⁶ Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. J Virol 2005;79(6):3851-4.

⁵⁷ Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005 Aug 18;436(7053):946-52.

⁵⁸ Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, Wiese M, Wedemeyer H, Ruppert T, Rispeter K, Henklein P, Sijts A, Hengel H, Klotzel PM, Rehmann B. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 2004;114(2):250-9.

⁵⁹ Ferreon JC, Ferreon AC, Li K, Lemon SM. Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Biol Chem* 2005;280(21):20483-92.

⁶⁰ Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(8):2986-91.

⁶¹ de Lucas S, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis* 2005;191(1):93-9.

⁶² François C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignol A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. Expression of hepatitis C virus proteins

interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol* 2000;74(12):5587-96.

⁶³ Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230(2):217-27.

⁶⁴ Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285(5424):107-10.

⁶⁵ Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S, Lai MM. Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol* 2006;80:866-874.

⁶⁶ Crotta S, Ronconi V, Ulivieri C, Baldari CT, Valiante NM, Abrignani S. Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. *Eur J Immunol* 2006;36: 919-929.

⁶⁷ Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195:35-41.

-
- ⁶⁸ Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43-49.
- ⁶⁹ Zhao LJ, Zhang XL, Zhao P, Cao J, Cao MM, Zhu SY, Liu HQ, Qi ZT. Upregulation of ERK and p38 MAPK signaling pathways by hepatitis C virus E2 envelope protein in human T lymphoma cell line. *J Leukoc Biol* 2006;80:424-432.
- ⁷⁰ Nattermann J, Nischalke HD, Feldmann G, Ahlenstiel G, Sauerbruch T, Spengler U. Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J Viral Hepat* 2004;11:519-526.
- ⁷¹ Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce proand anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2003;170:5615-5624.
- ⁷² Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T, Spengler U. Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)-core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol Lett* 2002;84:89-95.
- ⁷³ Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 2005;128:1034-1041.

⁷⁴ Kaukinen P, Sillanpaa M, Kotenko S, Lin R, Hiscott J, Melen K. Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. *Virology* 2006;3:66.

⁷⁵ Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, Kurt-Jones E. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 2004;127:1513-1524.

⁷⁶ Brady MT, MacDonald AJ, Rowan AG, Mills KH. Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. *Eur J Immunol* 2003;33:3448-3457.

⁷⁷ Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitazawa S, Ishido S, Sada K. Non-structural protein 4A of hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* 2006;87:1935-1945.

⁷⁸ Konan KV, Giddings TH Jr, Ikeda M, Li K, Lemon SM, Kirkegaard K. Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *J Virol* 2003;77: 7843-7855.

⁷⁹ Norris S, Doherty DG, Collins C, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogeneous and include Valpha24-JalphaQ and gammadelta T cell receptor bearing cells. *Hum Immunol* 1999;60:20–31.

⁸⁰ Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 1999;163:2314–21.

⁸¹ Doherty DG, O’Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000;174:5-20.

⁸² Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol* 2004;76:743-759.

⁸³ Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004;173:6072-6081.

⁸⁴ Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AE. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* 2006;43:573-580.

⁸⁵ Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 2006;55:869-877.

⁸⁶ Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Perez R, Rodriguez M, Fdez-Morera JL, Fuentes D, Rodríguez-Rodero S, González S, López-Larrea C. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2005;192:162-165.

⁸⁷ Li Y, Zhang T, Ho C, Orange JS, Douglas SD, Ho WZ. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol* 2004;76:1171-1179.

⁸⁸ Riordan SM, Skinner NA, Kurtovic J, Locarnini S, McIver CJ, Williams R. Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflamm Res* 2006;55:279-285.

⁸⁹ Dolganiuc A, Garcia C, Kodys K, Szabo G. Distinct Toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection. *World J Gastroenterol* 2006;12:1198-1204.

⁹⁰ Dolganiuc A, Chang S, Kodys K, Mandrekar P, Bakis G, Cormier M. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J Immunol* 2006;177:6758-6768.

⁹¹ Parker GA, Picut CA. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol* 2005;33:52-62.

⁹² Ghaffar Y, Dorgham L, Lotfy N, Faris L, Sultan Y, Khairy A. Effect of interferon therapy on radionuclide imaging in chronic liver diseases due to HCV infection. *J Nucl Med* 1995;36:1587-1589.

⁹³ Burgio VL, Ballardini G, Artini M, Caratozzolo M, Bianchi FB, Levrero M. Expression of co-stimulatory molecules by Kupffer cells in chronic hepatitis of hepatitis C virus etiology. *Hepatology* 1998;27:1600-1606.

⁹⁴ Hiraoka A, Horiike N, Akbar SM, Michitaka K, Matsuyama T, Onji M. Expression of CD163 in the liver of patients with viral hepatitis. *Pathol Res Pract* 2005;201:379-384.

⁹⁵ Royer C, Steffan AM, Navas MC, Fuchs A, Jaeck D, Stoll-Keller F. A study of susceptibility of primary human Kupffer cells to hepatitis C virus. *J Hepatol* 2003;38:250-256.

⁹⁶ Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 1997;185:777-784.

⁹⁷ Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:17-58.

⁹⁸ Albert ML, Decalf J, Pol S. Plasmacytoid dendritic cells move down on the list of suspects: in search of the immune pathogenesis of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008;49(6):1069-78.

⁹⁹ Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* 2006;22(5):561-9.

¹⁰⁰ Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 2002;76(24):12584-95.

¹⁰¹ Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194(10):1395-406.

¹⁰² Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, Nguyen TN, Day CL, Purkis DR, Reiser M, Kim AY, Lucas M, Klenerman P, Walker BD. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 2002;76(12):6104-13.

¹⁰³ Garcia Monzón C, Garcia Buey L, Moreno Otero R. Mecanismos de lesión hepatocelular por los virus de la hepatitis. *Gastroenterol Hepatol* 1997;20:461-466.

¹⁰⁴ Fischer R, Baumert T, Blum H. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007;13(36): 4865-4872.

¹⁰⁵ Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54: 1024-1033.

¹⁰⁶ Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007;14:32-43.

¹⁰⁷ Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Imawari M. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol* 1997; 158: 5283-5291.

¹⁰⁸ Gremion C, Grabscheid B, Wolk B, Moradpour D, Reichen J, Pichler W, Cerny A. Cytotoxic T lymphocytes derived from patients with chronic hepatitis C virus infection kill bystander cells via Fas-FasL interaction. *J Virol* 2004; 78: 2152-2157.

¹⁰⁹ Cheng G, Zhong J, Chisari FV. Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(22):8499-8504.

¹¹⁰ Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, Carney DS, Wang T, Ishida H, Yoneyama M, Fujita T, Saito T, Lee WM, Hagedorn CH, Lau DT,

Weinman SA, Lemon SM, Gale M Jr. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(15):6001-6.

¹¹¹ Cerny A, Chisari FV. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*. 1992;258(5079):135-40.

¹¹² Von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 2007;132(2):667-78.

¹¹³ JW Steinke, L Borish. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: S441-45.

¹¹⁴ Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.

¹¹⁵ Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.

¹¹⁶ Price DA, Klenerman P, Booth BL, Phillips RE, Sewell AK. Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today* 1999; 20: 212-216.

-
- ¹¹⁷ Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928.
- ¹¹⁸ Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-115.
- ¹¹⁹ Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 1067-1068.
- ¹²⁰ Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145-176.
- ¹²¹ Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, Gronenborn AM, Clore GM. Highresolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science* 1994; 263: 1762-1767.
- ¹²² Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through T cell chemotaxis in HCV infection 7157 integrins. *Science* 1996; 271: 981-983.
- ¹²³ Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445.

¹²⁴ Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187: 129-134.

¹²⁵ Wald O, Weiss I, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: Pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 2007;39:50–62.

¹²⁶ Locati M, Otero K, Schioppa T, Signorelli P, Perrier P, Baviera S. The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy* 2002;57:972–82.

¹²⁷ Cyster JG, Ngo VN, Ekland EH, Jun MD, Sedgwick JD, Ansel KM. Chemokines and B-cell homing to follicles. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;246:87-92.

¹²⁸ Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Förster R, Cyster JG.. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 2002;416:94-9.

¹²⁹ Trebst C, Ransohoff RM. Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2001;58:1975-80.

¹³⁰ Kivisakk P, Trebst C, Liu Z. T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking. *Clin Exp Immunol* 2002;129:510-8.

-
- ¹³¹ Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8389-94.
- ¹³² Kadoya H, Nagano-Fujii M, Deng L, Nakazono N, Hotta H. Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter. *Microbiol Immunol* 2005;49:265-273.
- ¹³³ Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004;126:529-540.
- ¹³⁴ Balasubramanian A, Munshi N, Koziel MJ, Hu Z, Liang TJ, Groopman JE. Structural proteins of hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells. *J Gen Virol* 2005;86:3291-3301.
- ¹³⁵ Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 2001;75:6209-6211.
- ¹³⁶ Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV.. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 75: 7059-66.

¹³⁷ Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002; 12: 957-964.

¹³⁸ Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 2005; 174: 3992-3998.

¹³⁹ Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptative immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91.

¹⁴⁰ Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3⁺CD56⁺ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 1999;163:2314-2321.

¹⁴¹ Saadoun D, Bieche I, Maisonobe T, Asselah T, Laurendeau I, Piette JC. Involvement of chemokines and type 1 cytokines in the pathogenesis of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis neuropathy. *Arthritis Rheum* 2005;52:2917-2925.

¹⁴² Bancherau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.

¹⁴³ Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 151-161.

¹⁴⁴ Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Eng J Med* 2006; 354: 610-21.

¹⁴⁵ PL Shields, CM Morland, M Salmon, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C infected liver. *J Immunol* 1999; 163: 6236-43.

¹⁴⁶ Reis e, Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:476-483.

¹⁴⁷ Forster R, Valos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008;8:362-371.

¹⁴⁸ Charo I, Ransohoff R. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-21.

¹⁴⁹ Maini M, Boni C, Ogg G, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertolotti A.. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus specific CD8+ T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999; 117: 1386-1396.

¹⁵⁰ Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Robbins GK, Casson DR, Reiser M, Dusheiko G, Allen TM, Chung RT, Walker BD, Klenerman P. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2004; 3: 924-36.

¹⁵¹ Larrubia JR, Herberg JA, Reignat S. Chemokine receptor expression and cytokine production of HBV-specific CD8 cells. *J Hepatol* 2000; 32 (S2): 90.

¹⁵² Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1: 23-61.

¹⁵³ Hou W, Kang H, Kim B. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J Exp Med* 2009;2:214-230.

¹⁵⁴ Kleinschek M, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy E, Turner S, Raskin L, Desai B, Faubion W, de Waal R, Pierce R, McClanahan T, Kastelein R. *J Exp Med* 2009;3:432-442.

¹⁵⁵ Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998; 101: 746-754.

¹⁵⁶ Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999; 20: 254-257.

¹⁵⁷ Nansen A, Christensen JP, Andreasen SØ, Bartholdy C, Christensen JE, Thomsen AR. The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity. *Blood* 2002; 99: 1237-1245.

¹⁵⁸ Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344-345.

¹⁵⁹ Costa-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639-646.

¹⁶⁰ Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol* 2008;180:214-221.

¹⁶¹ Bertoletti A, Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection?. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 403-8.

¹⁶² Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315:672–676.

¹⁶³ Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 207–219.

¹⁶⁴ Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response

to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 1996; 157: 4511–4520.

¹⁶⁵ Ishiguro N, Takada A, Yoshioka M. Induction of interferon-inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma from human endothelial cells infected with Influenza A virus. *Arch Virol* 2004; 149: 17–34.

¹⁶⁶ Narumi S, Yoneyama H, Inadera H. Chemokines as inflammatory mediators in chronic HCV infection 685 and unaffected by GM-CSF in vivo, in contrast to IL-1beta and IFN-gamma. *Cytokine* 2000; 12: 1007–1016.

¹⁶⁷ Matikainen S, Pirhonen J, Miettinen M. Influenza A and sendai viruses induce differential chemokine gene expression and transcription factor activation in human macrophages. *Virology* 2000; 276: 138–147.

¹⁶⁸ Nazar AS, Cheng G, Shin HS. Induction of IP-10 chemokine promoter by measles virus: comparison with interferon-gamma shows the use of the same response element but with differential DNA-protein binding profiles. *J Neuroimmunol* 1997; 77: 116–127.

¹⁶⁹ Borgland SL, Bowen GP, Wong NC, Libermann TA, Muruve DA. Adenovirus vector-induced expression of the C-XC chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-kappaB. *J Virol* 2000; 74: 3941–3947.

¹⁷⁰ Butera D, Marukian S, Iwamaye AE. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005; 106: 1175–1182.

¹⁷¹ Bieche I, Asselah T, Laurendeau I. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* 2005; 332: 130–144.

¹⁷² Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74:360–369.

¹⁷³ Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M. Expression of IFNinducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997;158: 5536–5544.

¹⁷⁴ Nishioji K, Okanou T, Itoh Y. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 2001;123: 271–279.

¹⁷⁵ Apolinario A, Diago M, Lo Iacono O. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 551–562.

¹⁷⁶ Nishioji K, Okanou T, Itoh Y. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 2001;123: 271–279.

¹⁷⁷ Romero AI, Lagging M, Westin J. Interferon (IFN)-gamma -Inducible Protein-10: Association with Histological Results, Viral Kinetics, and Outcome during Treatment with Pegylated IFN- alpha 2a and Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis* 2006; 194: 895–903.

¹⁷⁸ Butera D, Marukian S, Iwamaye AE. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005; 106: 1175–1182.

¹⁷⁹ Romero AI, Lagging M, Westin J. Interferon (IFN)-gamma -Inducible Protein-10: Association with Histological Results, Viral Kinetics, and Outcome during Treatment with Pegylated IFN- alpha 2a and Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis* 2006; 194: 895–903..

¹⁸⁰ Diago M, Castellano G, Garcia-Samaniego J. Association of pretreatment serum interferon inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2006; 55: 374–379.

¹⁸¹ Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 1996; 157: 4511–4520.

¹⁸² Ishiguro N, Takada A, Yoshioka M. Induction of interferon-inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma from human endothelial cells infected with Influenza A virus. *Arch Virol* 2004; 149: 17–34.

¹⁸³ Farber JM. HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 223–230.

¹⁸⁴ Stylianou E, Yndestad A, Sikkeland LI. Effects of interferon-alpha on gene expression of chemokines and members of the tumour necrosis factor superfamily in HIVinfected patients. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 279–285.

¹⁸⁵ Mahalingam S, Chaudhri G, Tan CL, John A, Foster PS, Karupiah G. Transcription of the interferon gamma (IFNgamma)-inducible chemokine Mig in IFN-gamma-deficient mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 7568–7574.

¹⁸⁶ Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163: 6236–6243.

¹⁸⁷ Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Perez E. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2861–2870.

-
- ¹⁸⁸ Butera D, Marukian S, Iwamaye AE. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005; 106: 1175–1182..
- ¹⁸⁹ Bieche I, Asselah T, Laurendeau I. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* 2005; 332: 130–144.
- ¹⁹⁰ Helbig KJ, Ruszkiewicz A, Semendric L, Harley HA, McColl SR, Beard MR. Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation. *Hepatology* 2004; 39: 1220–1229.
- ¹⁹¹ Helbig KJ, George J, Beard MR. A novel I-TAC promoter polymorphic variant is functional in the presence of replicating HCV in vitro. *J Clin Virol* 2005; 32: 137–143.
- ¹⁹² Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 1991; 3: 165–183.
- ¹⁹³ Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990; 347: 669–671.
- ¹⁹⁴ Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 1988; 141: 1018–1025.
- ¹⁹⁵ Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. Nuclear factor-kappa B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection. *J Immunol* 1997;158: 3483–3491..

-
- ¹⁹⁶ Hashimoto S, Gon Y, Asai Y. p38 MAP kinase regulates RANTES production by TNF-alpha-stimulated human pulmonary vascular endothelial cells. *Allergy* 1999; 54:1168–1172.
- ¹⁹⁷ Lin YL, Liu CC, Chuang JI. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virusinfected human liver cells. *Virology* 2000; 276: 114–126.
- ¹⁹⁸ Matsukura S, Kokubu F, Kubo H. Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 255–264.
- ¹⁹⁹ Soo HM, Garzino-Demo A, Hong W. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002; 303: 253–277.
- ²⁰⁰ Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121–127.
- ²⁰¹ Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217–242.
- ²⁰² Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145–176.

²⁰³ Luster AD. Chemokines–chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436–445.

²⁰⁴ Kusano F, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2000; 80: 415–422.

²⁰⁵ Leifeld L, Dumoulin FL, Purr I. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *J Pathol* 2003; 199: 335–344.

²⁰⁶ Leroy V, Vigan I, Mosnier JF. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 829–841.

²⁰⁷ Nischalke HD, Nattermann J, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U, Dumoulin FL. Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 357–359.

²⁰⁸ Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:455–481.

²⁰⁹ Lukacs NW, Kunkel SL, Allen R. Stimulus and cell-specific expression of C-X-C and C-C chemokines by pulmonary stromal cell populations. *Am J Physiol* 1995; 268:L856–L861.

-
- ²¹⁰ McManus CM, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia. *J Immunol* 1998; 160: 1449–1455.
- ²¹¹ Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 1998; 72: 4756–4764.
- ²¹² Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;113: 1214–1223.
- ²¹³ Bug G, Aman MJ, Tretter T, Huber C, Peschel C. Induction of macrophage-inflammatory protein 1 alpha (MIP-1alpha) by interferon-alpha. *Exp Hematol* 1998; 26: 117–123.
- ²¹⁴ Schwarz M, Radeke HH, Resch K, Uciechowski P. Lymphocyte-derived cytokines induce sequential expression of monocyte- and T cell-specific chemokines in human mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 52: 1521–1531.
- ²¹⁵ Miyamoto Y, Kim SU. Cytokine-induced production of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in cultured human astrocytes. *J Neurosci Res* 1999; 55: 245–251.

²¹⁶ Matikainen S, Pirhonen J, Miettinen M. Influenza A and sendai viruses induce differential chemokine gene expression and transcription factor activation in human macrophages. *Virology* 2000; 276: 138–147.

²¹⁷ Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993;260: 355–358.

²¹⁸ Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 177: 1821–1826.

²¹⁹ Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance Nkmediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995; 155: 3877–3888.

²²⁰ Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol* 1995; 25: 64–68.

²²¹ Lin CL, Suri RM, Ralston RA, Austyn JM, Roake JA. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4114–4122.

²²² Zhang T, Guo CJ, Li Y, Douglas SD, Qi XX, Song L. Interleukin-1beta induces macrophage inflammatory protein-1beta expression in human hepatocytes. *Cell Immunol* 2003;226:45–53.

²²³ Cooper MA, Fehniger TA, Ponnappan A, Mehta V, Wewers MD, Caligiuri MA. Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Eur J Immunol* 2001;31:792–801.

²²⁴ Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997;109:458–63.

²²⁵ Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997;61:246–57.

²²⁶ von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003;3:867-878.

²²⁷ Eksteen B, Miles A, Curbishley SM, Tselepis C, Grant AJ, Walker LS. Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10. *J Immunol* 2006;177:593-603.

²²⁸ Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions [see comments]. *Nature* 1999;401:708-712.

²²⁹ Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, Hay JB. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol* 2005;6:889-894.

²³⁰ Fattovich, G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin. Liver Dis*;2003;23,47–58.

²³¹ High level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol* 1995;69:6158–6169.

²³² Bukh J, Apgar CL, Yanagi M. Toward a surrogate model for hepatitis C virus: an infectious molecular clone of the GB virus-B hepatitis agent. *Virology* 1999;262:470–478.

²³³ Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Rev Immunol* 2005;5:215-229.

²³⁴ Major ME, Dahari H, Mihalik K, Puig M, Rice CM, Neumann AU, Feinstone SM. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* 2004;39:1709–1720.

²³⁵ Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of

hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15661–15668.

²³⁶Wieland S, Thimme R, Purcell R, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6669–6674.

²³⁷ Bigger C, Brasky K, Lanford R. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059–7066.

²³⁸ Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872–874.

²³⁹ Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195:35–42.

²⁴⁰ Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2004;173:6072–6081.

²⁴¹ Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825–829.

²⁴² McClary H, Koch R, Chisari F, Guidotti L.G. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 2000;74:2255–2264.

²⁴³ Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of α/β interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165–4173.

²⁴⁴ Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001;167:6701–6705.

²⁴⁵ Baron JL. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 2002;16:583–594.

²⁴⁶ Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, Cavalli A, Petit MA, Fiaccadori F. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J. Immunol.* 1990;145:3442–3449.

²⁴⁷ Rehermann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, Moss B, Sette A, Chisari FV. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus

polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1995;181:1047–1058.

²⁴⁸ Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 2002;169:3447–3458.

²⁴⁹ Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006–1007.

²⁵⁰ Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002;99:15661–15668.

²⁵¹ Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, Ferrari C. Virus-specific CD8⁺ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 2002;76:12423–12434.

²⁵² Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgilis S, Balestrieri A, Purcell RH, Cao A, Farci P. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 1994;343:388–390.

²⁵³ Chen M, Sällberg M, Sönnernborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, Peterson D, Milich DR. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1999;116:135–143.

²⁵⁴ Maruyama T, McLachlan A, Iino S, Koike K, Kurokawa K, Milich DR. The serology of chronic hepatitis B infection revisited. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:2586–2595.

²⁵⁵ Farci P, Alter HJ, Wong DC, Miller RH, Govindarajan S, Engle R, Shapiro M, Purcell RH. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7792–7796.

²⁵⁶ Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ, Wright EC, Cain CM, Buskell ZJ, Ishak KG, Iber FL, Toro D, Samanta A, Koretz RL, Perrillo RP, Goodman ZD, Knodell RG, Gitnick G, Morgan TR, Schiff ER, Lasky S, Stevens C, Vlahcevic RZ, Weinshel E, Tanwandee T, Lin HJ, Barbosa L. Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: a National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology* 2001;33:455–463.

²⁵⁷ Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzera A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000;288:339–344.

²⁵⁸ Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist, humoral responses decrease two

decades after recovery from a single source outbreak of hepatitis C. *Nature Med* 2000; 6:578–582.

²⁵⁹ Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nature Med* 1996; 2:1104–1108.

²⁶⁰ Nascimbeni M, Mizukoshi E, Bosmann M, Major ME, Mihalik K, Rice CM, Feinstone SM, Rehermann B. Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *J. Virol.* 2003;77, 4781–4793.

²⁶¹ Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Bigger C, Brasky KM, Wang XH, Ray SC, Thomas DL.. Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *J. Virol.* 2004;78,1575–581.

²⁶² Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003;302, 659–662.

²⁶³ Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191,1499–1512.

²⁶⁴ Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003;197:1645–1655.

²⁶⁵ Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgilis S, Balestrieri A, Purcell RH, Cao A, Farci P. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 1994;343:388–390.

²⁶⁶ Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992;258:135–140.

²⁶⁷ Mehta SH, Cox A, Hoover DR, Wang XH, Mao Q, Ray S, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 2002;359:1478–1483.

²⁶⁸ Rehmann B, Pasquinelli C, Mosier SM, Chisari FV. Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. *J Clin Invest* 1995;96:1527–1534.

²⁶⁹ Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM. Hepatitis C virus non-structural 5A protein induces interleukin-8 leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6295-106.

²⁷⁰ Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage

of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2992-97.

²⁷¹ Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghrayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8 (+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 68-76.

²⁷² Tseng T, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002; 195: 43-49.

²⁷³ Hoshida Y, Kato N, Yoshida H, Wang Y, Tanaka M, Goto T. Hepatitis C virus core protein and hepatitis activity are associated through transactivation of interleukin-8. *J Infect Dis* 2005;192:266-275.

²⁷⁴ Kadoya H, Nagano-Fujii M, Deng L, Nakazono N, Hotta H. Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter. *Microbiol Immunol* 2005;49:265-273.

²⁷⁵ Girard S, Vossman E, Misek DE, Podevin P, Hanash S, Brechot C. Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signaling revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology* 2004;40:708-718.

²⁷⁶ Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004;126:529-540.

-
- ²⁷⁷ Balasubramanian A, Munshi N, Koziel MJ, Hu Z, Liang TJ, Groopman JE, Ganju RK. Structural proteins of hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells. *J Gen Virol* 2005;86:3291-3301.
- ²⁷⁸ Heydtmann M. Macrophages in hepatitis B and Hepatitis C virus infection. *J Virol* 2009;83(7):2796-2802.
- ²⁷⁹ Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 2001;75:6209-6211.
- ²⁸⁰ Israeli E, Safadi R, Melhem A, Pappo O, Shibolet O, Klein A. Induction of oral immune regulation towards liver-extracted proteins for treatment of chronic HBV and HCV hepatitis: results of a phase I clinical trial. *Liver Int* 2004:295-30.
- ²⁸¹ Inoue M, Kanto T, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Yakushijin T. Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2006;45:190-196.
- ²⁸² Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;303:29-46.

-
- ²⁸³ Decalf J, Fernandes S, Longman R, Ahloulay M, Audat F, Lefrerre F. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex hemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *J Exp Med* 2007;204:2423-2437.
- ²⁸⁴ Ulsenheimer A, Gerlach JT, Jung MC, Gruener N, Wächter M, Backmund M, Santantonio T, Schraut W, Heeg MH, Schirren CA, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Plasmacytoid dendritic cells in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 643-51.
- ²⁸⁵ Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzl FP, Lederman MM, Lehmann PV, Valdez H. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 2004; 172: 4907-16.
- ²⁸⁶ Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Kaimori A, Oki C, Hiramatsu N, Kasahara A, Hayashi N. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology* 2006; 49: 58-63.
- ²⁸⁷ Szabo G, Dolgaunic A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology* 2005; 210: 237-47.
- ²⁸⁸ Nattermann J, Zimmermann H, Iwan A, von Lilienfeld-Toal M, Leifeld L, Nischalke HD. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction maybe associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006;44:945-954.

²⁸⁹ Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. *Nat Immunol* 2001; 1: 199-03.

²⁹⁰ Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD. Broad specificity of virus-specific CD4+ T helper cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 2002; 76: 12584-95.

²⁹¹ Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertolotti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamics of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32: 1117-24.

²⁹² Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395-406.

²⁹³ Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117: 933-941.

²⁹⁴ Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, Bouwer HG, Hinrichs DJ. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical diseases stages. *Hepatology* 2002;35:190-98.

-
- ²⁹⁵ Gruener HN, Lechner F, Jung F, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klennerman P. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001; 75: 1121-130.
- ²⁹⁶ Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B.. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-3458.
- ²⁹⁷ Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS.. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-49.
- ²⁹⁸ Accapezzato D, Francavilla V, Rawson P, Cerino A, Cividini A, Mondelli MU, Barnaba V. Subversion of effector CD8+ T cells differentiation in acute hepatitis C virus infection: the role of the virus. *Eur J Immunol* 2004;34:438-446.
- ²⁹⁹ N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 2007; 81: 9249-58.
- ³⁰⁰ Benito S, Larrubia JR, Sanz de Villalobos E, Calvino M, García-Buey ML, González-Mateos F. Association between HCV infection control and development of a specific cytotoxic cellular reservoir PD1 negative. *J Hepatol* 2008; 48(S2): S224.

-
- ³⁰¹ Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, Jin B, Xu B, Zou ZS. Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology* 2008;134: 1938-49.
- ³⁰² Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M. Impaired function of dendritic cells circulating in patients infected with hepatitis C virus who have persistently normal alanine aminotransferase levels. *Intervirology* 2006; 49: 58-63.
- ³⁰³ Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8 (+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004;113:963-72.
- ³⁰⁴ Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1062-71.
- ³⁰⁵ Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-8.
- ³⁰⁶ Cerwenka A, Morgan TM, Harmsen AG, Dutton RW. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. *J Exp Med* 1999; 189: 423-434.

³⁰⁷ Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, Suzuki K, Asakura H, Matsushima K. Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1999; 104: 49-57

³⁰⁸ Larrubia JR, Benito S, Calvino M, Sanz E, Parra T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008;14(47): 7149-7159.

³⁰⁹ Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, Mihm S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J Virol* 2001; 75:1332-1338.

³¹⁰ Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999;163:6236-6243.

³¹¹ Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997; 158:5536-5544.

³¹² Larrubia JR, Calvino M, Benito S, Sanz-de-Villalobos E, Perna C, Pérez-Hornedo J, González-Mateos F, García-Garzón S, Bienvenido A, Parra T. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2007;47: 632-641.

-
- ³¹³ Apolinario A, Majano PL, Lorente R, Núñez O, Clemente G, García-Monzón C. Gene expression profile of T-cell-specific chemokines in human hepatocyte-derived cells: evidence for a synergistic inducer effect of cytokines and hepatitis C virus proteins. *J Viral Hepat* 2005;12:27-37.
- ³¹⁴ Sillanpää M, Kaukinen P, Melén K, Julkunen I. Hepatitis C virus proteins interfere with the activation of chemokine gene promoters and downregulate chemokine gene expression. *J Gen Virol* 2008;89:432-443.
- ³¹⁵ Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation* 2003;10:247-57.
- ³¹⁶ Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-7.
- ³¹⁷ Kuziel WA, Dawson TC, Quinones M. CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherogenesis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis* 2003;167:25-32.
- ³¹⁸ Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:344-8.

³¹⁹ Glass WG, Chen BP, Liu MT, Lane TE. Mouse hepatitis virus infection of the central nervous system: chemokine-mediated regulation of host defense and disease. *Viral Immunol* 2002; 15: 261–272.

³²⁰ Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus specific CD8 (+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-80.

³²¹ Calvino M, Larrubia JR, Parra T. Analysis of CCR5 receptor expression on CD8 T cells during chronic hepatitis C virus infection. Role of pegylated interferon $\alpha 2b$ plus ribavirin. *J Hepatol* 2005;42(S2):155.

³²² Taub R, Greenbaum LE, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 117-27.

³²³ Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology* 2004; 127: 997-1000.

³²⁴ Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8 (+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280.

³²⁵ Constantini A, Mancini S, Giulodoro S, Butini L, Regnery CM, Silvestrini G. Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *J Immunol Methods* 2003; 278:145-155

³²⁶ Wang J, Holmes TH, Cheung R, Greenberg HB, He XS. Expression of chemokine receptors on intrahepatic and peripheral lymphocytes in chronic hepatitis C infection: its relationship to liver inflammation. *J Infect Dis* 2004;190:989-997.

³²⁷ Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-374.

³²⁸ Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C- infected liver. *J Immunol* 1999;163:6236-6243.

³²⁹ Dianhua J, Jiurong L, Jennifer H, Bao L, Zhou Z, Shuang Y. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest* 2004;114:291-299.

³³⁰ Rabin RL, Alston MA, Sircus JC, Knollmann-Ritschel B, Moratz C, Ngo D et al. CXCR3 is induced early on the pathway of CD4⁺ cell differentiation and bridges central and peripheral functions. *J Immunol* 2003;171:2812-2824.

³³¹ Exley MA, Koziel MJ. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 2004;40:1033–1040.

-
- ³³² Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:279–87.
- ³³³ Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:809–16.
- ³³⁴ Freeman AJ, Marinos G, Ffrench RA, Lloyd AR. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001;79:515–36.
- ³³⁵ Minutello MA, Piler P, Unutmaz D, Censini S, Kuo G, Houghton M, Brunetto MR, Bonino F, Abrignani S. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* 1993;178:17–25.
- ³³⁶ Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pilli M, Mori C, Zanelli P, Cavalli A, Elia G, Ferrari C. Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;35:1225–36.
- ³³⁷ Exley MA, He Q, Cheng O, Wang RJ, Cheney CP, Balk SP, Koziel MJ. Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. *J Immunol* 2002;168:1519–23.

³³⁸ Piali L, Weber C, Larosa G, Mackay CR, Springer TA, Clark-Lewis I, Moser B. The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shearresistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:961.

³³⁹ Nelson DR, Lim CG, Marousis JW, Fang GL, Davis L, Shen MS, Urdea JA, Kolberg J, Lau Y. Activation of tumor necrosis factor- α system in chronic hepatitis C virus infection. *Dig. Dis. Sci.* 1997;42:2487.

³⁴⁰ Narumi S, Tominaga M, Tamaru S, Shimai H, Okumura K, Nishioji Y, Itoh T, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J. Immunol.* 100; 158:5536.

³⁴¹ Curbishley SM, Eksteen B, Gladue RP, Lalor P, Adams DH. CXCR3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *Am J Pathol* 2005;167:887-899.

³⁴² Shields P, Morland C, Salmon M, Qin S, Hubscher S, Adams D. Chemokine and Chemokine Receptor Interactions Provide a Mechanism for Selective T Cell Recruitment to Specific Liver Compartments Within Hepatitis C-Infected Liver. *The Journal of Immunology* 1999;163:6236–6243.

³⁴³ Campbell JJ, Qin S, Bacon K, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors— differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoidcells. *J. Cell Biol* 1996;134:255-271.

-
- ³⁴⁴ Carr MW, Alon R, Springer TA. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of b1 and b2 integrins on T-lymphocytes. *Immunity* 1996;4:179-186.
- ³⁴⁵ Stanford M, Issekutz T. The relative activity of CXCR3 and CCR5 ligands in T lymphocyte migration: concordant and disparate activities in vitro and in vivo activity. *J. Leukoc. Biol.* 2003;74:791–799.
- ³⁴⁶ Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-571.
- ³⁴⁷ Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1998;338:436-445.
- ³⁴⁸ Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Chemokines and T lymphocyte activation. I. b chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J. Immunol.* 1996;156:2095-2104.
- ³⁴⁹ Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. Activation of dual T-cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 1995;269:1727-1737.
- ³⁵⁰ Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1b. *Nature* 1993;361:79-89.

³⁵¹ TanakaY, Kimata K, Adams DH, Eto S. Modulation of cytokine function by proteoglycans: sophisticated models for the regulation of cellular responses to cytokines. *Proc. Assoc. Am. Phys.* 1998;110:118-129.

³⁵² Edwards S, Lalor PF, Nash GB, Rainger GE, Adams DH. Lymphocyte traffic through sinusoidal endothelial cells is regulated by hepatocytes. *Hepatology* 2005;41:451-459.

³⁵³ Eksteen B, Afford SC, Wigmore SJ, Holt AP, Adams DH. Immunemediated liver injury. *Semin Liver Dis* 2007;27:351-366.

³⁵⁴ Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101:746–54.

³⁵⁵ Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997;158:5536-5544.

³⁵⁶ Ajuebor MN, Hogaboam CM, Le T, Proudfoot AE, Swain MG. CCL3/MIP-1alpha is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4(+) T cells to the liver. *Eur J Immunol* 2004;34:2907-2918.

-
- ³⁵⁷ Boisvert J, Kunkel EJ, Campbell JJ, Keeffe EB, Butcher EC, Greenberg HB. Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *J Hepatol* 2003;38:67–75.
- ³⁵⁸ Helbig KJ, Ruszkiewicz A, Semendric L, Harley HA, McColl SR, Beard MR. Expression of the CXCR3 ligand I-TAC by hepatocytes in chronic hepatitis C and its correlation with hepatic inflammation. *Hepatology* 2004;39:1220–9.
- ³⁵⁹ Butera D, Marukian S, Iwamaye AE, Hembrador E, Chambers TJ, Di Bisceglie AM, Charles ED, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Dustin LB. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005;106:1175-1182.
- ³⁶⁰ Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:829–41.
- ³⁶¹ Prezzi C, Casciaro MA, Francavilla V, Schiaffella E, Finocchi L, Chircu LV, Bruno G, Sette A, Abrignani S, Barnaba V. Virus-specific CD8(+) T cells with type 1 or type 2 cytokine profile are related to different disease activity in chronic hepatitis C virus infection. *Eur J Immunol* 2001;31:894–906.
- ³⁶² Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic

hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74:360–9.

³⁶³ Lichterfeld M, Leifeld L, Nischalke HD, Rockstroh JK, Hess L, Sauerbruch T. Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection. *J Infect Dis* 2002;185:1803–7.

³⁶⁴ Heydtmann M, Lalor PF, Eksteen JA, Hubscher SG, Briskin M, Adams DH. CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver. *J Immunol* 2005;174:1055-1062.

³⁶⁵ Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, Suzuki K, Asakura H, Matsushima K. Active participation of CCR5(–)CD8(–) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1999;104:49-57.

³⁶⁶ Ryan CT. Trials of Atravirine halted in treatment-naive patients. *J. Watch AIDS Clin. Care* 2005;17: 107.

³⁶⁷ McHale M, Abel S, Russell D, Gallagher J, Van Der Ryst E. Overview of phase 1 and 2a safety and efficacy data of maraviroc. In Third IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, July 24–27. International AIDS Society, Geneva, Switzerland, 2005.

³⁶⁸ Deeks SG. Challenges of developing R5 inhibitors in antiretroviral naive HIV-infected patients. *Lancet* 2006;367:711–713.

³⁶⁹ Woitas RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Matz B, Offergeld R, Sauerbruch T, Spengler U. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1721–8.

³⁷⁰ Wald O, Pappo O, Ari ZB, Azzaria E, Wiess ID, Gafnovitch I, Wald H, Spengler U, Galun E, Peled A. The CCR5Delta32 allele is associated with reduced liver inflammation in hepatitis C virus infection. *Eur J Immunogenet* 2004;31:249–52.

³⁷¹ Goulding C, McManus R, Murphy A, MacDonald G, Barrett S, Crowe J, Hegarty J, McKiernan S, Kelleher D. The CCR5-delta32 mutation: impact on disease outcome in individuals with hepatitis C infection from a single source. *Gut* 2005;54:1157–61.

³⁷² Woitas RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, KupferB, Matz B, Offergeld R, Sauerbruch T, Spengler U.. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1721-1728.

³⁷³ Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1468-1476.

³⁷⁴ Goddard S, Williams A, Morland C, Qin S, Gladue R, Hubscher SG, Adams DH. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation* 2001;72:1957-1967.

³⁷⁵ Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996;24:759-765.

³⁷⁶ Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol* 2001;2:102–107.

³⁷⁷ Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol* 1999;163:6236–6243.

³⁷⁸ Loetscher P, M. Uguccioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J. M. Dayer. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998;391:344–345.

³⁷⁹ Ahlenstiel G, Berg T, Woitas RP, Grunhage F, Iwan A, Hess L, Brackmann HH, Kupfer B, Schernick A, Sauerbruch T, Spengler U. Effects of the CCR5-Delta32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003;39:245–52.

³⁸⁰ Nattermann J, Nischalke HD, Feldmann G, Ahlenstiel G, Sauerbruch T, Spengler U.

Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J ViralHepat* 2004;11:519–26.

³⁸¹ Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klenerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1468–76.

³⁸² Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:352–60.

³⁸³ Locati M, Otero K, Schioppa T, Signorelli P, Perrier P, Baviera S, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy* 2002;57:972–82.

³⁸⁴ Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2000;118:346–55.

³⁸⁵ Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C

virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996;98:706–14.

³⁸⁶ Andres PG, Beck PL, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Bhan AK, Dawson T, Kuziel WA, Maeda N, MacDermott RP, Podolsky DK, Reinecker HC. Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine. *J Immunol* 2000;164:6303–12.

³⁸⁷ Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 1998;160:4018–25.

³⁸⁸ Tyner JW, Uchida O, Kajiwarra N, Kim EY, Patel AC, O’Sullivan, Walter MJ, Schwendener RA, Cook DN, Danoff TM, Holtzman MJ. CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. *Nat Med* 2005;11:1180–7.

³⁸⁹ Fischereder M, Luckow B, Hoher B, Wüthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H, Panzer U, Stahl RA, Hauser IA, Budde K, Neumayer H, Krämer BK, Land W, Schlöndorff. CC chemokine receptor 5 and renal transplant survival. *Lancet* 2001;357:1758–61.

³⁹⁰ Heydtmann M, Hardie D, Shields PL, Faint J, Buckley CD, Campbell JJ, Salmon M, Adams DH. Detailed analysis of intrahepatic CD8 T cells in the normal and hepatitis C-infected liver reveals differences in specific populations of memory cells with distinct homing phenotypes. *J Immunol* 2006;177:729-738.

³⁹¹ Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, Marche PN, Jouvin-Marche E. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:829-841.

³⁹² Boisvert J, Kunkel EJ, Campbell JJ, Keefe EB, Butcher EC, Greenberg HB. Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes. *J Hepatol* 2003;38:67-75.

³⁹³ Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:1899-1914.

³⁹⁴ Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001;276:9945-9954.

³⁹⁵ Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;29:140-148.

-
- ³⁹⁶ Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates Nfκappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001;166:6812-6819.
- ³⁹⁷ Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.
- ³⁹⁸ Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:97-104.
- ³⁹⁹ Fontaine H, Nalpas B, Poulet B, Carnot F, Zylberberg H, Brechot C, Pol S. Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis C. *Hum Pathol* 2001;32:904-909.
- ⁴⁰⁰ Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:1334-1340.
- ⁴⁰¹ Lagging LM, Westin J, Svensson E, Aires N, Dhillon AP, Lindh M, Wejstål R, Norkrans G. Progression of fibrosis in untreated patients with hepatitis C virus infection. *Liver* 2002;22:136-144.

⁴⁰² Salmi M, Adams DH, Jalkanen S. Lymphocyte trafficking in the intestine and liver. *Am. J. Physiol.* 1998;274:1-12.

⁴⁰³ Crispe NI, Mehal WZ. Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today* 1996;17:522-529.

⁴⁰⁴ Afford SC, Hubscher S, Strain AJ, Adams DH, Neuberger JM. Apoptosis in the human liver during allograft-rejection and end-stage liver-disease. *J. Pathol* 1995;176:373-384.

⁴⁰⁵ Kay EJ, O'Dowd, R. Thomas, R. Alyusuf, S. Sachithanandan, R. Robinson, C. B. Walsh, J. F. Fielding, and M. B. Leader. 1997. Mild abnormalities in liver histology associated with chronic hepatitis: distinction from normal liver histology. *J. Clin. Pathol.* 50:929-935.

⁴⁰⁶ Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163: 6236–6243.

⁴⁰⁷ Butera D, Marukian S, Iwamaye AE, Hembrador E, Chambers TJ, Di Bisceglie AM, Charles ED, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Dustin LB. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005; 106: 1175–1182.

⁴⁰⁸ Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74:360–369.

⁴⁰⁹ Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky JM, Neumann AU, Ferrari C, Missale G, Haagmans BL, Schalm SW, Zeuzem S, Negro F, Verheij-Hart E, Hellstrand K; DITTO-HCV Study Group. Interferon (IFN)-gamma -Inducible Protein-10: Association with Histological Results, Viral Kinetics, and Outcome during Treatment with Pegylated IFN- alpha 2a and Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis* 2006; 194: 895–903.

⁴¹⁰ Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066.

⁴¹¹ Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Bigger C, Brasky KM, Wang XH, Ray SC, Thomas DL. Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *J Virol* 2004;78:1575-1581

⁴¹² Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates histological severity and lobular inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 74: 360–369; 2003.

⁴¹³ Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55: 97–179.

⁴¹⁴ Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675–705.

⁴¹⁵ Hirano F, Komura K, Fukawa E, Makino I. Tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced RANTES chemokine expression via activation on NF- κ B and p38 MAP kinase: roles of TNF- α in alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2003; 38: 483–489.

⁴¹⁶ Butera D, Marukian S, Iwamaye AE, Hembrador E, Chambers TJ, Di Bisceglie AM, Charles ED, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Dustin LB. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005;106:1175–1182.

⁴¹⁷ Yamauchi K, Akbar SM, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3 α in chronic viral hepatitis: prognostic importance of macrophage inflammatory protein-3 α during interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2002;9:213–220.

⁴¹⁸ Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky JM, Zeuzem S, von Wagner M, Negro F, Schalm SW, Haagmans BL, Ferrari C, Missale G, Neumann AU, Verheij-Hart E, Hellstrand K; DITTO-HCV Study Group. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006;44:1617–1625.

⁴¹⁹ Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 177: 1821–1826.

⁴²⁰ Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance Nkmediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995; 155: 3877–3888.

⁴²¹ Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol* 1995; 25: 64–68.

⁴²² Lin CL, Suri RM, Rahdon RA, Austyn JM, Roake JA. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4114–4122.

⁴²³ Leifeld L, Dumoulin FL, Purr I, Janberg K, Trautwein C, Wolff M, Manns MP, Sauerbruch T, Spengler U. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *J Pathol* 2003; 199: 335–344.

⁴²⁴ Majano PL, García-Monzón C, López-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernández-Ruiz E, García-Iglesias C, Borque MJ, Moreno-Otero R. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis: Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest* 1998;101:1343–52.

-
- ⁴²⁵ Lichterfeld M, Leifeld L, Nischalke HD, Rockstroh JK, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Reduced CC Chemokine Receptor (CCR) 1 and CCR5 Surface Expression on Peripheral Blood T Lymphocytes from Patients with Chronic Hepatitis C Infection *J Infect Dis* 2002;185:1803-1807.
- ⁴²⁶ Spengler U, Kacsmarska A, Grunderbl A. Involvement of immunological mechanisms in the pathogenesis of non-A, non-B hepatitis. In: Zuckerman AJ, ed. *Viral hepatitis and liver disease*. New York: AR Liss, 1988:576-9.
- ⁴²⁷ D'Amico G, Frascaroli G, Bianchi G, Transidico P, Doni A, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat Immunol* 2000; 1:387-91.
- ⁴²⁸ Natterman J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS* 2003;17:1457–1462.
- ⁴²⁹ Xiang J, George SL, Wunschmann S, Chang Q, Klinzman D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1a, MIP-1b and SDF-1. *Lancet* 2004;363:2040–2046.
- ⁴³⁰ Herrmann JM, Malkus P, Schekman R. Out of the ER—outfitters, escorts and guides. *Trends Cell Biol* 1999; 9:5-7.

-
- ⁴³¹ Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938–941.
- ⁴³² Solari R, Offord RE, Remy S, Aubry JP, Wells TN, Whitehorn E, Oung T, Proudfoot AE.. Receptor-mediated endocytosis of CC-chemokines. *J Biol Chem* 1997;272:9617-20.
- ⁴³³ Pelchen-Matthews A, Signoret N, Klasse PJ, Fraile-Ramos A, Marsh M. Chemokine receptor trafficking and viral replication. *Immunol Rev* 1999; 168:33-49.
- ⁴³⁴ Nattermann J, Nishallke HD, Feldmann G, Ahlenstiel G, Sauerbruch T, Spengler U. Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor. *J Viral Hepat* 2005;11:519–526.
- ⁴³⁵ Schols D. HIV co-receptors as targets for antiviral therapy. *Curr Top Med Chem* 2004; 4: 883-893.
- ⁴³⁶ Huber M, Olson WC, Trkola A. Antibodies for HIV treatment and prevention: window of opportunity? *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 317: 39-66.
- ⁴³⁷ Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA* 2006; 296: 815-826.

-
- ⁴³⁸ Gong X, Feng H, Zhang S, Yu Y, Li J, Wang J, Guo B. Increased expression of CCR5 in experimental autoimmune myocarditis and reduced severity induced by anti-CCR5 monoclonal antibody. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 781-791
- ⁴³⁹ Suzuki K, Kawauchi Y, Palaniyandi SS, Veeraveedu PT, Fujii M, Yamagiwa S, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Okada Y, Ajioka Y, Watanabe K, Hosono M, Asakura H, Aoyagi Y, Narumi S. Blockade of interferon-gamma-inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells. *Pathol Int* 2007; 57: 413-420.
- ⁴⁴⁰ Singh UP, Singh S, Taub DD, Lillard JW Jr. Inhibition of IFN-gamma-inducible protein-10 abrogates colitis in IL-10^{-/-} mice. *J Immunol* 2003; 171: 1401-1406.
- ⁴⁴¹ Mohan K, Issekutz TB. Blockade of chemokine receptor CXCR3 inhibits T cell recruitment to inflamed joints and decreases the severity of adjuvant arthritis. *J Immunol* 2007;179: 8463-8469.
- ⁴⁴² Singh UP, Venkataraman C, Singh R, Lillard JW Jr. CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007;7: 111-123.
- ⁴⁴³ Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, Suzuki K, Asakura H, Matsushima K. Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1999; 104: 49-57